Das Thrombozyten-Metamorphogramm

Evolution und Adhäsion von Thrombozyten unter Einwirkung gerinnungshemmender Substanzen sowie bei hämorrhagischen Diathesen

Helmut Kreiter

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555227_0019

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. SCHWIEGK

DAS THROMBOZYTEN-METAMORPHOGRAMM

Evolution und Adhäsion von Thrombozyten unter Einwirkung gerinnungshemmender Substanzen sowie bei hämorrhagischen Diathesen

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Kreiter

aus Kaiserslautern / Pfalz

München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. H. SCHWIEGK
Mitberichterstatter:	Priv.Doz.Dr. R. MARX
Dekan:	Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 12. 1958

MEINER MUTTER IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	7
B. METHODIK	8
Übersicht	8
Einzelheiten des Versuchsganges bei 20 °C	9
a) Präparierung der Objektträger	9
b) Entnahme des Blutes	10
c) Spülen der Präparate	11
d) Fixierung	11
Einzelheiten des Versuchsganges bei	12
37 °C und 0 °C	13
C. ERGEBNISSE	14
I. Verhalten von Nativblut-Thrombozyten	18
II. Verhalten von Thrombozyten unter Einwirkung gerinnungshemmender Substanzen	21
Na-Citrat und Na-Oxalat	21
Sequestrensalze	28
Novocain und ähnliche Substanzen	31
Heparine und Heparinoide	35
III. Verhalten von Thrombozyten unter Einwirkung einiger klinisch interessanter Pharmaka, "Sintrom", "Thrombodym", "Hibernon"	39
IV. Verhalten von Thrombozyten verschiedener hämorrhagischer Diathesen	44
D. SCHLUSSWORT	57

A. EINLEITUNG

Das Thrombozyten-Metamorphogramm (R. MARX) ist eine Methode, die geeignet erscheint, zwei Grundeigenschaften von Thrombozyten, Evolution und Adhäsion, qualitativ und quantitativ in ihrer Abhängigkeit von der Zeit zu erfassen.

Es kann heute mit Sicherheit angenommen werden, daß die morphologischen Veränderungen, die bei Thrombozyten unter Einwirkung bestimmter chemischer und physikalischer Reize beobachtet werden, Ausdruck eines funktionellen Geschehens sind.

Da es bis heute nicht gelungen ist, eine exakte Methode zur Erfassung der funktionellen Eigenschaften von Thrombozyten zu schaffen, etwa auf Grund geeigneter chemischer Tests, nimmt die "Funktionsmorphologie" (MARX) in der Beurteilung der Funktionen von Thrombozyten eine zentrale Stellung ein. Es muß jedoch immer wieder gefordert werden, daß die Ergebnisse der Funktionsmorphologie durch geeignete andere Methoden überprüft und bestätigt werden.

In den Arbeiten von G. KÖPPEL und R. MARX war die Morphologie von Thrombozyten in den verschiedenen Phasen der Blutgerinnung eingehend untersucht worden. Es ergab sich, daß elektronenmikroskopisch zu wenig Zellen beurteilt werden können, um ohne enormen Zeitaufwand eine Aussage über die Gesamttendenz der Thrombozyten-Evolution machen zu können.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es, eine Methode auszuarbeiten, mit Hilfe derer es möglich ist, in routinemäßiger Arbeit unter einem möglichst geringen Aufwand von Zeit und technischen Hilfsmitteln Grundeigenschaften von Thrombozyten zu erfassen und auszuwerten.

Es werden zunächst kurz die morphologischen Eigenschaften von Thrombozyten aus Nativblut untersucht. Daran schließt sich an die Prüfung von Antikoagulantien sowie einiger klinisch interessanter Pharmaka in ihrer Wirkung auf Thrombozyten unter verschiedenen Temperaturen. Im letzten Abschnitt der Arbeit wird die Morphologie von Thrombozyten verschiedener hämorrhagischer Diathesen eingehend untersucht.

B. METHODIK

Um zu exakten wissenschaftlich verwertbaren Aussagen bezügl. der Eigenschaften von Thrombozyten des menschlichen Blutes zu kommen, war zunächst die Ausarbeitung einer geeigneten Methode zu deren Erfassung erforderlich. Die Ergebnisse der Untersuchungen mußten reproduzierbar sein, d.h. unter völlig identischen Versuchsbedingungen mußten gleiche Ergebnisse in qualitativer wie quantitativer Hinsicht erzielt werden. Zudem sollte die Methode ein möglichst rasches, rationelles Arbeiten erlauben, dessen Exaktheit bei Zuhilfenahme möglichst geringer technischer Hilfsmittel gewährleistet sein mußte.

Es erscheint daher angebracht, im Folgenden die angewandte Methode zur Darstellung der Eigenschaften haftender Thrombozyten eingehend zu beschreiben.

Der besseren Übersicht wegen sei zunächst die Arbeitsweise kurz zusammengefaßt dargelegt. Daran anschließend folgt eine genaue Beschreibung der einzelnen Phasen des üblichen Versuchsganges; zuletzt werden einige Besonderheiten der Methodik bei Versuchen unter einer Temperatur von 37 ^{o}C bezw. 0 ^{o}C dargelegt.

Übersicht:

Einer gesunden Versuchsperson wurde mittels einer Record-Spritze, der die jeweils zu untersuchende Substanz vorgelegt war, 2 ccm Blut entnommen. Nachdem durch leichte Kippbewegungen eine ausreichende Durchmischung des Blutes gewährleistet war, wurde ein Tropfen Blut an den Rand des Deckglases einer Neubauer-Zählkammer gebracht, deren Kammer mit Zaponlack überzogen war. Die Zählkammern wurden in feuchten Kammern aufbewahrt und nach Ablauf der erforderlichen Zeit in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die auf der Zaponlackfolie nach Beseitigung aller übrigen Bestandteile des Blutes haftenden Thrombozyten wurden alsdann in Osmiumsäure-Dampf fixiert. Eine Auswertung der Präparate wurde im Phasenkontrastfeld eines Lichtmikroskopes vorgenommen.

Einzelheiten:

a) Präparierung der Objektträger:

Um exakte quantitative Aussagen bezgl. Adhäsion und Evolution von Thrombozyten machen zu können, mußten zunächst zwei Forderungen erfüllt werden:

1. Schaffung einer genormten Flächeneinteilung.
2. Schaffung einer genormten Oberflächenbeschaffenheit.

Ad 1) Wir verwendeten bei all unseren Versuchen Neubauer-Zählkammern mit durchlaufender Quernute, auf der sich eine Zählkammer befindet. Doppelkammern waren nicht geeignet, da sich die auf der Kammer haftende Folie während des Spülens leichter ablöste. Es wurde darauf geachtet, daß bei vergleichenden Untersuchungen Kammern gleicher Breite, d.h. gleicher Quernutenlänge verwendet wurden. Damit war gewährleistet, daß die jeweils gleiche Menge Blut über die Kammer verteilt wurde.

Ad 2) Zur Schaffung einer genormten Beschaffenheit der Oberfläche wurden die Kammern mit Zaponlack (2%ige Lösung von Collodium in Amylacetat mit 5% abs. Alkohol) überzogen. Mittels eines mit Äther angefeuchteten Lappens wurde zunächst die Zählkammer peinlichst von Staub und dergl. gesäubert; alsdann wurde mit Hilfe eines staubfreien Glasstabes ein Tropfen Zaponlack auf die Mittelnute der Kammer aufgetragen. Durch leichtes Kippen der Zählkammer breitete sich der Lack gleichmäßig über die Fläche aus. Um eine möglichst dünne Zaponlackschicht zu erhalten, wurde die Kammer mehrmals über beide Längsseiten auf ein saugfähiges Filtrierpapier abgekippt, wodurch überflüssiger Lack abgesaugt wurde. Die so präparierten Kammern wurden zum Trocknen in staubfreien Petri-Schalen aufbewahrt.
Hierin beließen wir sie flach liegend etwa 20 bis 24 Stunden.

b) Entnahme des Blutes und Aufbringen auf die Kammer:

Die Entnahme des Blutes wurde mittels einer 2 ccm Record-Spritze aus der Armvene vorgenommen. Als Kanüle wurden V2A Nadeln Größe 12 verwendet.

Bei der Prüfung der Wirksamkeit pharmakologischer Substanzen wurde das Blut der selben normalen Versuchsperson verwendet (Autor).

Die zu prüfende Substanz wurde in der erforderlichen Konzentration der Spritze vorgelegt. Dabei wurde gewöhnlich ein Volumenverhältnis Testsubstanz : Blut von 1 : 10 eingehalten (0,2 ad 2 ccm). War dies wegen der Konzentration der verwendeten Substanz nicht möglich, so wurde ein Teil Substanz mit vier Teilen Blut versetzt. (Verhältnis 1:5).

Als Testsubstanz wurden handelsübliche Präparate verwendet. Machte das Vorliegen einer Substanz in Pulver- oder Kristallform die Herstellung einer Lösung erforderlich, so war darauf zu achten, daß diese dem Blut isoton war. Es zeigte sich, daß hypertone Lösungen morphologische Veränderungen an Thrombozyten bewirken, die leicht mit einem pharmakospezifischen Effekt zu verwechseln sind.

Nach Abnahme des Blutes wurde der Spritzenstempel über die Markierungsmarke hinaus angezogen und durch leichtes Kippen der Spritze Testsubstanz und Blut ca. 2 Minuten durchmischt. Es darf angenommen werden, daß nach Ablauf dieser Zeit die jeweils vorgelegte Substanz ihre spezifische Wirkung auf die Thrombozyten weitgehend entfaltet hat. Diese Versuchsanordnung hatte zudem den Vorteil, daß die Thrombozyten möglichst rasch nach der Extravasation mit der Folie in Kontakt kamen und somit morphologische Veränderungen teilweise ausgeschaltet werden konnten, die allein infolge der veränderten physikalisch-chemischen Umweltbedingungen nach der Extravasation u.U. auftreten.

In üblicher Weise wurde alsdann die Kammer beschickt, indem ein Tropfen Blut an den Rand des Deckglases gebracht wurde, von wo es sich infolge Kapillarwirkung über die gesamte Kammer gleichmäßig ausbreitete. Wir verwendeten hierbei niemals die ersten Tropfen aus der Spritze, da diese im Spritzenansatz u.U. nicht ausreichend mit der Testsubstanz in Berührung gekommen waren.

Nach Beschickung von gewöhnlich drei Objektträgern wurden diese in feuchten Kammern aufbewahrt. Um die morphologischen Veränderungen von Thrombozyten in ihrer Abhängigkeit von der Zeit darzustellen, wurde je eine Kammer nach 5 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten abgespült.

c) Spülen der Präparate:

Im weiteren Verlauf des Versuchsganges war ein besonders vorsichtiges und sorgfältiges Arbeiten erforderlich, da bei geringster Beschädigung der Folie ein völliges Ablösen derselben meist nicht mehr zu vermeiden war. Nach Ablauf der erforderlichen Sedimentationszeit wurde das Deckglas vorsichtig abgeschoben, die Kammer alsdann mit der Schichtseite nach unten in einen Objekthalter (bestehend aus einem selbst angefertigten Drahtgestell) eingelegt und sofort in die Spülflüssigkeit getaucht. Als solche wurde phys.NaCl-Lösung (0,9%ig) verwendet, welche die zu prüfende Testsubstanz in gleicher Konzentration enthielt wie das zu untersuchende Blut. Damit war eine Einwirkung der Testsubstanz auf die Thrombozyten vom Augenblick der Blutentnahme bis zur Fixierung gewährleistet. Durch leichtes Schwenken der Kammer mittels des Objekthalters in der Waschflüssigkeit wurde die Folie von den nicht haftenden Bestandteilen des Blutes restlos gesäubert. Hierzu reichte eine Zeit von 4 Minuten aus, in Verlauf derer die Spülflüssigkeit einmal erneuert wurde.

d) Fixierung der Präparate:

Zur Fixierung der auf der Folie haftenden Thrombozyten wurde Osmiumsäure-Lösung (2%ig) verwendet.

In eine feuchte Kammer wurde eine kleine offene Petri -Schale gestellt, in die einige Tropfen Osmium-Säure gebracht wurden. Die Präparate wurden aufrecht in die feuchte Kammer gestellt; nach einer Zeit von 4 Minuten waren die Thrombozyten durch den sich entwickelnden Osmium-Säure-Dampf ausreichend fixiert.

Nach der Fixierung wurden die Präparate durch Schwenken in aqua dest. nachgewaschen, um Kristallbildungen durch die in der Spülflüssigkeit enthaltenen Salze auf der Folie zu verhindern.

Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet waren, standen sie zur Begutachtung bereit.

e) Auswertung der fertigen Präparate:

Eine Auswertung der Präparate wurde im Phasenkontrastmikroskop bei starker Vergrößerung (Okular 12,5x, Objektiv 40x) vorgenommen. Hierbei erfolgte sowohl eine quantitative Erfassung (Adhäsion) der auf der Folie haftenden Thrombozyten als auch gleichzeitig eine qualitative Differenzierung in Evolutionsstadien. Ausgewertet wurde jeweils die Hälfte der 16 auf der Kammer angezeigten Quadrate, die gewöhnlich der Erythrozytenzählung dienen. (Jedes der acht ausgewerteten Quadrate ist in 16 kleinere Quadrate eingeteilt und hat eine Fläche von je 1/25 qmm.)

Der gesamte nunmehr ausführlich dargelegte Versuchsgang wurde bei einer Zimmertemperatur von 20 bis 22 ^{o}C durchgeführt. Abschließend seien noch einige Bemerkungen angefügt über die Arbeitsweise bei Versuchen unter anderen Temperaturen.

1) Versuche bei 37 ^{o}C:

Um zu einer exakten Aussage über das Verhalten von Blutplättchen bei einer Temperatur von 37 ^{o}C zu kommen, mußte während des gesamten Versuchsganges eine Temperaturkonstanz von 37 ^{o}C gewährleistet sein. Zu diesem Zwecke wurden Kanüle und Spritze mit vorgelegter Testsubstanz auf 37 ^{o}C erwärmt. Nach Abnahme des Blutes wurde die Spritze in den unter einer Temperatur von 37 ^{o} stehenden Brutschrank gebracht, dort erst der Spritzenstempel angezogen und Blut mit vorgelegter Testsubstanz vermischt. Die zu beschickenden Kammern waren ebenfalls im Wärmeschrank auf die erforderliche Temperatur gebracht, wie auch die erforderlichen feuchten Kammern und die Waschflüssigkeit. Um eine auch nur geringfügige Abkühlung während des Abschiebens des Deckglases und während des Wechsels der Waschflüssigkeit zu vermeiden, wurde am Arbeitsplatz durch eine Lampe eine Lufttemperatur von ca. 37 ^{o} geschaffen. Unter der gleichen Temperatur fand auch die Fixierung in feuchten Kammern statt.

2) Versuch bei 0^0C:

Aufgabe der Methode war es, bei diesen Versuchen eine Temperaturkonstanz von 0^oC einzuhalten. Zu diesem Zwecke wurden analog dem unter 1) Dargelegten Spritze, Zählkammer, feuchte Kammer und Spülflüssigkeit im Eisschrank auf die erforderliche Temperatur gebracht. Der Versuchsgang entsprach im Übrigen dem oben beschriebenen.

C. E R G E B N I S S E

Zum besseren Verständnis der Darstellung der Ergebnisse des Thrombozyten-Metamorphogramms sollen zu Beginn einige Ausführungen grundsätzlicher Art über die Eigenschaften von Thrombozyten stehen.

In Teil I wird das Verhalten von Thrombozyten untersucht, die nicht unter der Einwirkung eines gerinnungshemmenden Agens standen, sog. Nativblut-Thrombozyten. Es wird ihr Verhalten in verschiedenen Phasen der Gerinnung untersucht, vor allem interessierte dabei im Hinblick auf die Funktionsmorphologie die Evolution der Thrombozyten vor und während des Beginns der Fibrinbildung.

Von diesen Ergebnissen ausgehend kann dann in Teil II die Wirkung verschiedener gerinnungshemmender sowie sonstiger klinisch interessanter Substanzen auf Evolution und Adhäsion von Thrombozyten dargelegt werden, wobei in ihrer chemischen Zusammensetzung ähnliche Substanzen zu Gruppen zusammengefaßt sind. An Hand einiger klinisch interessanter Pharmaka wird die Abhängigkeit der Evolution von der Temperatur aufgezeigt.

In Teil III werden die Ergebnisse morphologischer Untersuchungen von Blutplättchen verschiedener hämorrhagischer Diathesen und anderer Blutkrankheiten dargestellt. Wir setzten in diesen Fällen dem Blut jeweils Na citr. (760 mg%) als gerinnungshemmendes Agens zu.

Die Ergebnisse, die wir mit Hilfe des Thrombozyten-Metamorphogramm erzielten, sind relativ. Alle Zahlenangaben bezgl. Adhäsion und Evolution stellen keine absoluten Zahlen dar, sondern sind nur zu verstehen durch vergleichende Beurteilung verschiedener Versuche unter verschiedenen Bedingungen.

Die Thrombozyten des menschlichen Blutes sind wesentlich an der Blutgerinnung beteiligt. Es sind heute drei Faktoren nachgewiesen, die die Gerinnung in der Vorphase (Bildung aktiver Thrombokinase), ersten Phase (Thrombinbildung) und zweiten Phase (Fibrinbildung) beeinflussen. Auch am Zustandekommen der Retraktion (dritte Phase der Blutgerinnung) sind die Thrombozyten beteiligt. Es ist bis heute nicht ge-

klärt, ob diese Faktoren, deren chemische Zusammensetzung unbekannt ist, allein durch den Zerfall der Blutplättchen abgegeben werden, oder auch durch eine aktive Sekretion. Auf letztere Möglichkeit weist u.U. das Auftreten von flüssigkeitsgefüllten Bläschen in ausgebreiteten Thrombozyten hin. KÖPPEL vermutet, daß diese bei mangelnder Thrombokinase-Aktivität auftreten. Neben der Aufgabe dieser chemisch aktiven Substanzen wirken die Blutplättchen rein mechanisch bei der Festigung des Blutgerinnsels mit, in dem sich die entstandenen Fibrinfibrillen in den Thrombozyten verankern ("Druckknöpfe" R.MARX). Im Gegensatz zu dieser letzteren Eigenschaft der Thrombozyten, die einer direkten Beobachtung zugänglich ist, kann die o.a. Funktion der Thrombozyten mit Hilfe der Funktionsmorphologie beurteilt werden.

Blutplättchen, die intravasal 1 bis 5μ große runde bis ovale homogene Körperchen darstellen haben die Fähigkeit, an gefäßfremden Oberflächen zu haften infolge der ihnen eigenen Klebrigkeit. Diese Eigenschaft von Thrombozyten wird als Adhäsion bezeichnet. Es ist ungeklärt, ob sie eine Eigenschaft des Plättchen-Protoplasma an sich ist, die u.U. einer Aktivierung bedarf, oder ob sie erst sekundär unter bestimmten Bedingungen auftritt. Die Adhäsion wird in vorliegender Arbeit an einer Zaponlackfolie geprüft. Sie wird angegeben durch die absolute Zahl der auf einer jeweils gleich großen Fläche klebenden Thrombozyten (siehe oben unter Methodik).

Die Adhäsion hängt ab von der absoluten Thrombozytenzahl im Blut; sie kann über längere Zeit nur in gerinnungsgehemmten Blut untersucht werden, da bei Eintreten der Gerinnung über der Folie schwebende Thrombozyten in den entstehenden Thrombus fest verankert werden und daher nicht mehr weiter sedimentieren können. In Blut, dessen Gerinnung gehemmt ist, hängt die Adhäsion weiterhin ab von der Temperatur, von der Beschaffenheit der Haftfläche, von der Art des gerinnungshemmenden Agens und von der Zeit, die den Thrombozyten zur Sedimentation zur Verfügung steht. Es kann angenommen werden, daß die Thrombozyten eine bestimmte Zeit mit der Folie in Berührung sein müssen, um eine so feste Verbindung mit ihr einzugehen, daß sie während des Abspülens der nicht klebenden Bestandteile des Blutes sich nicht mehr von der Folie lösen. Die Annahme von K.H.KÖHL, daß die Besiedelung der Testfläche nach 1/2 Stunde abgeschlossen sei, konnten wir

nicht bestätigen; wir sahen regelmäßig eine Zunahme der Thrombozytenzahl auf der Folie bis zu einer Sedimentationszeit von 60 Minuten. Ungeklärt ist, inwiefern nach einer Sedimentationszeit von mehreren Stunden keine Erhöhung der Zahl klebender Thrombozyten eintrat. U.U. spielt hierbei der Besatz der Folie mit sedimentierten Erythrozyten eine Rolle (KÖHL), wie auch die erhöhte Agglutination der Thrombozyten, wodurch eine relative Verminderung der Thrombozytenzahl eintritt.

Blutplättchen, die mit einer gefäßfremden Oberfläche in Berührung gekommen sind, und infolge ihrer Klebrigkeit an dieser haften, gehen bestimmte gesetzmäßige morphologische Veränderungen ein, die schließlich zu ihrem Verfall führen. Diese zweite Grundeigenschaft von Thrombozyten wird als E v o l u t i o n bezeichnet.

Zunächst beobachtet man an den intravasal runden oder ovalen Plättchen das Auftreten von kleinen dünnen Fortsätzen, die als Pseudopodien bezeichnet werden, sich rasch verlängern und an Zahl zunehmen. In diesem Stadium sind die Thrombozyten kompakt, homogen und lichtmikroskopisch undurchstrahlbar. Im weiteren Verlauf der Evolution breitet sich das Plasma aus, meist beginnend zwischen zwei Pseudopodien. Der voll ausgebreitete Thrombozyt weist eine Differenzierung auf in Granulomer, ein dem Zellkern entsprechendes körniges Zentrum und Hyalomer, der aus dem ausgebreiteten Plasma bestehenden gut durchstrahlbaren strukturlosen Außenzone.

Wir unterscheiden dementsprechend vier Evolutionsstadien, deren jeweiliger Anteil an der Gesamtzahl ausgewerteter Thrombozyten in Prozenten angegeben wird:

1. Stadium (Rundform):

Runde bis ovale undurchstrahlbare Plättchen, die im Lichtmikroskop keine Pseudopodien aufweisen, was jedoch deren Vorhandensein nicht unbedingt ausschließt. Sie entsprechen also in lichtmikroskopischer Betrachtung der intravasalen Zirkulationsform.

2. Stadium (Pseudopodienform):

Die Plättchen weisen deutliche Pseudopodien auf, sind jedoch noch undurchstrahlbar und zeigen keine Ausbreitung.

3. Stadium (Beginnende Ausbreitungsform):

Meist an der Wurzel oder zwischen zwei Pseudopodien beginnt die Ausbreitung des Plasma. In diesem Stadium kann das Granulomer noch dicht und undurchstrahlbar sein.

4. Stadium (Endausbreitung):

Die Plättchen sind weit ausgebreitet, Differenzierung in Granulomer und Hyalomer ist deutlich; sie sind in ihrer Gesamtheit durchstrahlbar.

Als Beispiel zu Obigem sei hier die Evolution von Thrombozyten unter Einwirkung von Na citr. 760 mg% in der im weiteren Verlauf der Arbeit üblichen Weise angeführt:

60 Min.	2%	15%	18%	65%

Dies besagt, daß nach Ablauf einer Sedimentationszeit von 60 Minuten 2% der Thrombozyten in Stadium I, 15% in Stadium II, 18% in Stadium III und 65% in Stadium IV vorlagen.

Zur graphischen Darstellung der Evolution unter Einwirkung verschiedener gerinnungshemmender Substanzen wird der prozentuale Anteil von Plättchen in Stadium IV an der Gesamtzahl ausgewerteter Plättchen aufgeführt nach einer Sedimentationszeit von 60 Minuten.

Die dritte Grundeigenschaft von Thrombozyten ist ihre Fähigkeit, miteinander zu verkleben. Man bezeichnet sie als Agglomerulation bezw. Agglutination. Sie beruht auf der Klebrigkeit der Thrombozyten. Man unterscheidet zwei Formen: Leibesagglutination und Pseudopodienagglutination (R. MARX). Im Thrombozytenmetamorphogramm wird die Agglutination nicht sicher erfaßt.

I. Das Verhalten von Nativblut-Thrombozyten

Einleitend seien einige Abweichungen von dem üblichen, oben beschriebenen Versuchsgang kurz dargelegt.

Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Um die morphologischen Veränderungen sogleich nach der Extravasation genau studieren zu können wurden die Kammern umgehend nach Abnahme des Blutes beschickt. Der Spülflüssigkeit (0,9%ige Na Cl Lös.) wurden 760 mg% Na citr. beigegeben, um während des Spülens ein evtl. Weiterschreiten morphologischer Veränderungen nach Möglichkeit zu verhindern.

1) Sedimentationszeit 1,5 Minuten:

Die Folie war mit einer hohen Zahl von Thrombozyten besiedelt. Es waren keine Zeichen einer Gerinnung zu beobachten, wie auch keine Bildung von Agglutinaten. Die Plättchen befanden sich in der Mehrzahl in Stadium I u. II (Rund- und Pseudopodienformen), der Rest in Stadium III. Die Plättchen in ihrer Gesamtheit oder bei Stadium III des Granulomer waren noch kompakt und undurchstrahlbar.
Thrombozytengesamtzahl: 702
Davon in Stadium I und II: 82%
in Stadium III: 18%

2) Sedimentationszeit 3 Minuten:

Die Thrombozyten, deren Zahl sich auf annähernd 1000 erhöht hatte, befanden sich fast ausnahmslos in Stadium III und IV. Bei zahlreichen Plättchen war jedoch noch ein kompaktes und undurchstrahlbares Zentrum erhalten. Die Ausbreitung war ungleichmäßig und nicht konzentrisch; so bot sich ein an Formen sehr reichhaltiges Bild. Große runde Ausbreitungsformen waren nicht zu finden.

Auf der Folie klebten zahlreiche Fibrinfäden und einzelne geronnene Blutkuchen, bestehend aus einem Fibrinnetz, in dessen

Maschen zahlreiche Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten hingen.

Es gelang, einige "Netze" von roten und weißen Blutkörperchen völlig frei zu spülen. Wir sahen dann ein engmaschiges Netz von Fibrinfäden verschiedener Stärke, an deren Kreuzungsstellen Thrombozyten saßen, die keine Zeichen einer Ausbreitung aufwiesen, strukturlos und undurchstrahlbar erschienen. Bei starker Vergrößerung war zu erkennen, daß Fibrin in den Thrombozyten verankert war. (siehe Abb. 1).

Wo sich auf der Folie Thrombozyten in Stadium I oder II fanden, sahen wir gewöhnlich ein oder mehrere Fibrinfäden in diese einstrahlen.

3) Sedimentationszeit 5 Minuten:

Das Blut war angeronnen und ließ sich nur noch teilweise von der Folie abspülen. Die klebenden Thrombozyten waren weit ausgebreitet, zeigten jedoch meist ungleichmäßige Randkonturen. Bei der Mehrzahl der Plättchen war das Granulomer undurchstrahlbar. Auf der Folie fanden sich reichlich Fibrinfäden. Im übrigen ergab sich das gleiche Bild wie unter 2.

Eine zahlenmäßige Auswertung war nicht mehr möglich, da Teile der Folie mit einem dichten Blutkuchen besetzt waren.

4) Sedimentationszeit 8 Minuten:

Das Blut war in seiner Gesamtheit geronnen, ließ sich jedoch an einigen Stellen ablösen. Hier waren auf der Folie neben Fibrin reichlich Agglutinate zu beobachten (siehe Abb. 1 a), deren weit ausgebreitete Thrombozyten zu zerfallen schienen.

Zusammenfassung und Diskussion:

Nativblut-Thrombozyten, die auf einer Zaponlack-Folie zum Kleben gebracht wurden, fanden sich nach 1,5 Minuten in der Mehrzahl als Rund- oder Pseudopodienformen, nur bei wenigen waren Zeichen einer beginnenden Ausbreitung zu beobachten. Nach 3 Minuten hatte sicht-

bar die Gerinnung eingesetzt; es fanden sich fast ausnahmslos Ausbreitungsformen. Nach 5 Minuten war die Gerinnung fortgeschritten und nach 8 Minuten die gesamte Blutmenge geronnen. Wo es gelang, das Fibrinnetz von den anderen korpuskulären Teilchen des Blutes frei zu spülen, wurden Thrombozyten beobachtet, in die sich Fibrinfäden verankert hatten; sie waren kompakt und undurchstrahlbar und zeigten keine Ausbreitung.

Es wird angenommen, daß es sich hierbei um Blutplättchen handelt, die nicht mit einer gefäßfremden Oberfläche in Berührung kamen und sich daher nicht ausbreiteten. Sie wurden frei schwebend von der Gerinnung gleichsam überrascht und dienen den Fibrinfibrillen zur Verankerung. Sie dienen somit einer Festigung des entstehenden Thrombus.

Die auf Abb 1 sichtbaren ausgebreiteten Thrombozyten liegen unter dem Fibrinnetz der Folie an. An ausgebreiteten Thrombozyten konnten wir keine Fibrinverankerung feststellen. Es wäre zu untersuchen, ob und welche morphologischen Veränderungen diese in das Fibrinnetz eingebauten Thrombozyten nach Ablauf längerer Zeiten eingehen; dem stehen jedoch zunächst methodische Schwierigkeiten entgegen. Weiterhin wäre zu diskutieren, ob diese Thrombozyten u.U. eine Rolle bei dem Vorgang der Retraktion spielen und welcher Art diese ist.

II. Das Verhalten von Thrombozyten unter Einwirkung verschiedener gerinnungshemmender Substanzen:

Natrium-Citrat und Natrium-Oxalat:

1) Versuche bei einer Temperatur von 20 bis 22°C:

a) Na-citr. 760 mg%: (Siehe Abb. 2 u. 2a)
An Hand von Blut, dessen Gerinnung durch Na-citr. 760 mg% gehemmt war, wurde zunächst die Brauchbarkeit, d.h. Exaktheit des Thrombozytenmetamorphogramm geprüft. Zu diesem Zweck untersuchten wir das Blut von 10 normalen Versuchspersonen mit normaler Thrombozytenzahl. Der Einfachheit halber führen wir hier die Ergebnisse der Untersuchungen bei 4 Personen an:

Versuchsperson I.P.:

5 Min.	13%	39%	42%	6%
30 "	4%	28%	29%	39%
60 "	3%	13%	19%	65%

Gesamtzahl: 246/303/322

Versuchsperson H.K.

5 Min.	9%	46%	44%	1%
30 "	3%	25%	31%	41%
60 "	2%	16%	18%	64%

Gesamtzahl: 272/340/460

Versuchsperson S.I.:

5 Min.	7%	47%	43%	3%
30 "	3%	24%	29%	44%
60 "	5%	15%	18%	62%

Gesamtzahl: 264/674/630

Versuchsperson F.S.:

5 Min.	1%	27%	66%	6%
30 "	1%	17%	22%	60%
60 "	2%	10%	17%	71%

Gesamtzahl: 326/306/476

Ergebnis:

Bei Betrachtung der Evolution stellen wir eine nur sehr geringe Schwankungsbreite fest. So differiert der Anteil Thrombozyten in Stadium IV an der Gesamtzahl ausgewerteter Thrombozyten bei den vier aufgeführten Versuchspersonen zwischen 1 und 7 %. Es darf angenommen werden, daß diese Fehlerbreite zumindest teilweise auf unterschiedlicher Beurteilung der Evolutionsstadien einzelner Thrombozyten zurückzuführen ist, also als "normale Fehlerbreite" anzusehen ist. Bei mehrmaliger Untersuchung des gleichen Blutes ergaben sich Werte mit einer Fehlerbreite von nur 2 bis 5 %. Um jedoch in der Beurteilung der Evolution nur solche Differenzen zu erfassen, die tatsächlich eine pharmakospezifische Wirkung darstellen, sehen wir eine Differenz bis zu 10 % als normale Fehlerbreite an.

Bei Betrachtung der Adhäsion stellen wir eine starke Differenz zwischen den einzelnen Versuchspersonen fest. Es besteht die Möglichkeit, daß diese Differenz auf ein unterschiedliches Adhäsionsvermögen von Thrombozyten verschiedener Personen zurückzuführen ist. Daneben kämen u.U. kleinste Temperaturschwankungen ursächlich in Frage. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Zu beachten ist, daß trotz dieser starken Schwankungen der Adhäsion die Prozentzahlen der Evolutionsstadien die normale Fehlerbreite nicht überschreiten.

Weiterhin prüften wir an Blut, das unter der Einwirkung von Na-citr. 760 mg% stand, das Verhalten von Thrombozyten nach einer Sedimentationszeit von 2 bis 24 Stunden.

2 Std.	9%	16%	11%	64%

Gesamtzahl: 288

Die Evolution entsprach den nach 1 Stunde erhaltenen Werten.

4 Std.	5%	23%	16%	56%

Gesamtzahl: 302

An den ausgebreiteten Thrombozyten waren keine Auflösungserscheinungen zu beobachten. Auffallend war eine verhältnismäßig hohe Zahl von Plättchen in Stadium II mit langen Pseudopodien. Die Adhäsion war geringfügig erhöht.

8 Std.	9%	32%	14%	45%

Gesamtzahl: 334

Die Zahl der Plättchen in Stadium II hatte um 9% zugenommen, während die Zahl der Ausbreitungsformen um 11% abgenommen hatte. Die Zunahme der Pseudopodienformen um 9% entsprach fast der Zunahme der Gesamtzahl klebender Thrombozyten um 10% gegenüber dem 4 Std.-Wert, sodaß angenommen wird, daß es sich um eine relative Verminderung der Plättchen in Stadium IV handelte. Wir können daraus schließen, daß die zusätzlich sedimentierten Thrombozyten sich zunächst nicht ausgebreitet haben. Wir sahen reichlich Formen mit überlangen Pseudopodien, die teilweise netzartig verflochten waren. An langen Pseudopodien sahen wir spindelförmige Auftreibungen, ohne daß eine Ausbreitung zu beobachten war. Diese Erscheinung beschreibt auch SCHWENDENER nach Untersuchungen an freischwebenden Thrombozyten.

Nur ganz vereinzelt waren am Hyalomer der Form IV Auflösungserscheinungen zu beobachten. Auch an Thrombozyten in beginnender Ausbreitung waren sehr lange Pseudopodien zu beobachten.

24 Std.	6%	15%	17%	62%

Gesamtzahl: 290

Nach Ablauf von 24 Std. war wieder eine starke Zunahme der Ausbreitungsformen zu beobachten; die Werte entsprachen etwa den 2 Std.-Werten. Die Zahl der klebenden Plättchen war etwas geringer. Die Pseudopodienformen zeigten die oben bereits beschriebenen morphologischen Sonderheiten. Auch bei diesem Präparat waren Auflösungserscheinungen nur ganz vereinzelt zu beobachten.

Ergebnis:
Adhäsion und Evolution von Thrombozyten sind im Wesentlichen nach 1 Stunde abgeschlossen. Thrombozyten, die nach Ablauf dieser Zeit sedimentieren und der Folie adhaerent werden, befinden sich in Stadium II und weisen überlange Pseudopodien auf, deren Länge ein Vielfaches des Plättchendurchmessers beträgt. Die Evolution dieser Plättchen geht langsamer vonstatten als bei solchen, die bald nach der Extravasation mit der Folie in Berührung kommen.

Die Ursache hierfür kann in der längeren Einwirkung des gerinnungshemmenden Agens liegen, oder in einer Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion infolge langer Extravasation.

b) Na-citr. 380 mg%: (siehe Abb. 3 u. 4)

5 Min.	9%	24%	65%	2%
30 "	8%	18%	32%	42%
60 "	5%	4%	20%	71%

Gesamtzahl: 274/330/434

c) Na-citr. 190 mg%:

5 Min.	15%	30%	45%	10%
30 "	4%	12%	24%	60%
60 "	12%	6%	12%	70%

Gesamtzahl: 246/446/484

d) Na-oxal. 200 mg%:

5 Min.	10%	35%	55%	-
30 "	5%	13%	33%	49%
60 "	4%	7%	18%	71%

Gesamtzahl: 406/578/560

Ergebnis der Versuche b bis d: (siehe Abb. 3 u. 4)
Mit fallender Konzentration Na-Citrat wird die Evolution beschleunigt. So erhielten wir bei einer Konzentration von 190 mg% nach 30 Min. etwa dieselben Werte wie bei einer solchen von 760 mg% nach 60 Min. Die Hemmung der Evolution war auch bei niederer Konzentration noch deutlich: Einer Nativblut-Evolution von 100% Ausbreitungsformen standen hier 70% gegenüber. Die Adhäsion war im Großen und Ganzen unverändert.

Die Wirkung von Na-oxalat 200 mg% auf Evolution und Adhäsion von Blutplättchen war der von Na-citr. 380 mg% etwa identisch.

2) Versuche bei einer Temperatur von 37°C:

a) Na-citr. 760 mg%: (Siehe Abb. 5)

5 Min.	42%	50%	6%	2%
30 "	40%	52%	5%	3%
60 "	40%	50%	7%	3%

Gesamtzahl: 258/628/670

Nach dreistündiger Sedimentationszeit erhielten wir folgendes Ergebnis:

14%	79%	7%	--

Gesamtzahl: 101

Ein Präparat beließen wir 24 Stunden im Brutschrank unter 37°C. Nach Waschung und Fixierung fanden sich auf der Folie gleichmäßig verteilt eine große Menge Granula. Sehr wahrscheinlich dürfte es sich hierbei um Auflösungsprodukte von Plättchen handeln; es konnten außerdem auf der Folie Bakterien nachgewiesen werden.

Ergebnis:

War durch eine geeignete Versuchsanordnung (siehe Methodik) eine gleichbleibende Temperatur von 37°C gewährleistet, so erhielten wir Werte, die sich wesentlich von denjenigen der oben beschriebenen Versuche bei 20°C unterschieden.

Die Ausbreitung der Thrombozyten war außerordentlich stark gehemmt: So waren nach 60 Min. nur 10% der Plättchen in Ausbreitung begriffen oder voll ausgebreitet gegenüber 80 bis 85% bei Versuchen unter 20°C. Überwiegend wurden Plättchen in Stadium II beobachtet. Nach 5 Min. waren die Pseudopodien kurz und stummelartig, oft etwas aufgetrieben und verzweigt. Nach 30 Min. hatten sie an Länge zugenommen und wiesen öfters eine Spindelbäumchen - artige Verzweigung auf. Auffallend ist, daß die Werte der Evolution nach 5, 30 und 60 Minuten fast identisch sind, also keine Evolution im Sinne einer mehr oder minder raschen Entwicklung der Thrombozyten stattfindet (absolute Hemmung). Die Adhäsion war stark erhöht, jedoch nach 3 Stun-

den auf ca. 1/6 der nach einer Stunde klebenden Thrombozyten herabgesetzt. Bei den nach 24 Std. beobachteten Granula, die in großer Zahl gleichmäßig über die Folie verteilt waren, dürfte es sich um Reste von zerfallenden Thrombozyten, Bakterien und dergl. handeln; Thrombozyten waren nicht festzustellen.

Als Ursache für das völlig veränderte Verhalten von Thrombozyten bei Versuchen unter 37 °C werden zwei Möglichkeiten diskutiert:

1) Es handelt sich um eine Steigerung der spezifischen gerinnungs- und damit evolutionshemmenden Wirkung des Na-Citrat infolge erhöhter Temperatur im Sinne einer erhöhten chemischen Wirksamkeit und schnelleren Ablaufs der chemischen Prozesse.

2) Thrombozyten reagieren allgemein bei erhöhter Temperatur (Körpertemperatur!) in anderer Weise. Die Ursache würde also in diesem Falle direkt im Verhalten der Thrombozyten liegen und nicht in der veränderten chemischen Wirksamkeit des Na-Citrat.

Da nach 3 Stunden die Zahl der Plättchen stark herabgesetzt war, wird angenommen, daß die Klebrigkeit rasch abnimmt. Da sich nach 24 Stunden keine Thrombozyten mehr auf der Folie fanden, jedoch reichlich Granula, die zum Teil als Zerfallsprodukte angesehen werden, wird geschlossen, daß zunächst die Klebrigkeit aufgehoben wird, die Thrombozyten sich infolgedessen von der Folie lösen und nach Ablauf mehrerer Stunden zerfallen.

Diese These bedarf jedoch noch eingehender Untersuchungen.

3) Versuche bei einer Temperatur von 0° bis 4°C:

Na-citr. 760 mg%:

5 Min.	14%	76%	10%	--
30 "	3%	26%	70%	1%
60 "	2%	28%	69%	1%

Gesamtzahl: 282/348/386

Nach 5 Min. sahen wir überwiegend Pseudopodienformen mit langen Ausläufern, die selten verzweigt waren. Oft sahen wir im Bereich eines Pseudopodiums knotenförmige Verdickungen und beginnende Ausbreitung des Hyalomers. Nach 30 Min. war die Ausbreitung weiter fortgeschritten, die Pseudopodien waren länger. Charakteristisch war die Ausbreitung des Hyalomers entlang eines Pseudopodiums nach einer oder beiden Seiten des Plättchens ("Schmetterlingsform"), wogegen eine gleichmäßige Rundausbreitung praktisch nicht beobachtet wurde. Auch nach 1 Std. befand sich die Mehrzahl der Plättchen in Stadium III: Die Formen waren von großer Vielfältigkeit und gaben Anlaß zu Vergleichen mit Formen aus dem Tier- und Pflanzenreich. Das Granulomer war kompakt und meist undurchstrahlbar.

Ergebnis:

Werden Thrombozyten sofort nach der Extravasation niederen Temperaturen (0° bis 4°C) ausgesetzt, so ist ihre Klebrigkeit nur geringfügig herabgesetzt. Die Evolution ist stärker gehemmt im Vergleich zu einer Versuchs-Temperatur von 20°C. Nach 1 Std. findet sich die Mehrzahl in beginnender Ausbreitung mit dichtem, undurchstrahlbarem Granulomer, während wir nur 1% große Endausbreitungsformen finden. Nach 30 Min. scheint die Evolution bereits abgeschlossen zu sein.

Da die chemische Aktivität der gerinnungshemmenden Substanz bei niederer Temperatur geringer sein müßte, wird angenommen, daß die beobachteten morphologischen Erscheinungen zurückzuführen sind auf eine Hemmung der physiologisch-chemischen Prozesse in Thrombozyten infolge Kälteeinwirkung.

Wirkung von Sequestren-Salzen
und ähnlichen Substanzen:

a) Di-Natrium-Sequestren 200 mg%:

5 Min.	58%	42%	--	--
30 "	79%	21%	--	--
60 "	46%	34%	21%	--

Gesamtzahl: 24/24/35

b) Di-Natrium-Sequestren 100 mg%: (siehe Abb. 6)

5 Min.	94%	6%	--	--
30 "	77%	20%	3%	--
60 "	41%	34%	25%	--

Gesamtzahl: 17/35/41

c) Di-Natrium-Sequestren 50 mg%: (siehe Abb. 7)

5 Min.	9%	22%	30%	39%
30 "	5%	7%	17%	71%
60 "	4%	2%	12%	82%

Gesamtzahl: /525/584

d) Sequestren-tetra-novocain 100 mg%+Na-citr.300 mg%:

5 Min.	38%	9%	25%	28%
30 "	33%	17%	22%	28%
60 "	29%	12%	20%	39%

Gesamtzahl: 32/63/129

e) Sequestren-tetra-Novocain 50 mg%+Na-citr.380 mg%:

5 Min.	27%	16%	52%	5%
30 "	6%	16%	31%	47%
60 "	8%	26%	12%	54%

Gesamtzahl: 37/352/374

f) Versenol 200 mg%:

5 Min.	41%	12%	37%	10%
30 "	17%	6%	32%	45%
60 "	11%	4%	7%	78%

Gesamtzahl: 59/194/267

g) Diäthyl-amino-essigsäure 100 mg%+Na-citr.380 mg%:

30 Min.	6%	48%	14%	32%
60 "	11%	42%	12%	35%

Gesamtzahl: 566/740

h) Substanz I 100 mg% + Na-citr. 380 mg%:

60 Min.	9%	39%	15%	37%

Gesamtzahl: 640

i) Substanz II 100 mg% + Na-citr. 380 mg%:

60 Min.	77%	23%	--	--

Gesamtzahl: 41

k) Substanz II 50 mg% + Na-citr. 380 mg%: (siehe Abb.8)

5 Min.	22%	60%	18%	--
30 "	8%	55%	36%	1%
60 "	7%	43%	40%	10%

Gesamtzahl: 226/334/406

l) Substanz II 10 mg% + Na-citr. 380 mg%:

60 Min.	7%	22%	52%	19%

Gesamtzahl: 416

m) Substanz II 2 mg% + Na-citr. 380 mg%:

60 Min.	3%	14%	23%	60%

Gesamtzahl: 694

Ergebnis der unter a) bis m) aufgeführten Versuche:

Unter Einwirkung von Sequestren 200 und 100 mg% verlieren die Thrombozyten fast völlig ihre Fähigkeit zu kleben. Die Evolution der wenigen klebenden Plättchen ist sehr stark gehemmt; Endausbreitungsformen konnten nicht beobachtet werden, es überwogen in lichtmikroskopischer Betrachtung bei Weitem intravasale Rundformen. Bei einem Abfall der Konzentration auf 50 mg% stieg die Adhäsion schlagartig auf Werte, die denjenigen von Citrat-gehemmtem Blut (380 mg%) entsprachen; auch die Hemmung der Evolution war nur noch sehr geringfügig.

Sequestren in chemischer Verbindung mit Novocain zeigt ebenfalls eine deutliche Hemmung der Evolution und Adhäsion bei einer Konzentration

von 100 mg% (unter Zusatz von Na-citr. 380 mg% zur Verhinderung der Gerinnung). Auch bei 50 mg% sahen wir noch eine über den Citrat-spezifischen Effekt hinausgehende Hemmung von Adhäsion und Evolution.

Trotz naher chemischer Verwandtschaft von Versenol mit Sequestren konnten wir bei einer hohen Konzentration von 200 mg% keine wesentliche Hemmung der Evolution beobachten, wohl aber eine Herabsetzung der Adhäsion.

Aus vorher Dargelegtem läßt sich bereits erkennen, daß die Hemmung der Adhäsion durch eine bestimmte chemische Substanz nicht unbedingt eine solche der Evolution einschließt. Auch Di-äthyl-amino-essigsäure zeigt in einer Konzentration von 100 mg% eine deutliche Wirkung auf Thrombozyten: Hier ist im Gegensatz zu Versenol die Evolution stark gehemmt, während die Adhäsion hoch ist. Die gleiche Wirkung erzielten wir durch Substanz I.

Substanz II wies eine Wirkung auf, die über diejenige von Sequestren noch hinausging; Adhäsion und Evolution waren unter 100 mg% fast völlig gehemmt; bei fallender Konzentration sahen wir im Gegensatz zu Sequestren bei 50 mg% noch eine starke Evolutionshemmung, die auch bei 10 mg% noch zu erkennen war: es wurden hier 19 % Endausbreitungsformen ausgezählt. Die Adhäsion war auf entsprechende Vergleichswerte von Na-citr. 380 mg% abgestiegen, während bezgl. der Evolution diese Vergleichswerte erst bei einer Konzentration von 2 mg% erreicht wurden.

Bei Sequestren 50 mg% fanden sich im Gegensatz zu Substanz II reichlich Agglutinate auf der Folie.

In den ausgebreiteten Thrombozyten fanden sich unter Einwirkung von Substanz II in Hyalomer wie Granulomer große Vakuolen.
(Zu Obigem siehe Abb. 6 bis 8).

Da Substanz II klinisch nicht erprobt war, prüften wir deren Toxizität am Kaninchen:

Es wurden einem gesunden Kaninchen 20 mg% Substanz II gelöst in 2 ccm NaCl-Lös. in die Ohrvene langsam injiziert. Nach Injektion von etwa 1 ccm der Lösung verstarb das Tier infolge Herzstillstand.

Untersuchung des Blutes vor der Injektion:

Es wurden nach 30 Min. 1120 Thrombozyten ausgezählt, die sich in der Mehrzahl in Stadium III und IV befanden.

Untersuchung des Blutes nach der Injektion:

Nach Eintritt des Todes wurde Herzblut abpunktiert; nach 30 Min. Sedimentationszeit wurden 800 Thrombozyten ausgezählt, deren Mehrzahl in Stadium I und II standen. Eine evtl. relative Verminderung der Thrombozytenzahl durch Agglutination konnte ausgeschlossen werden: Im Leerwert betrug deren Zahl 294 000, im Herzblut nach Eintritt des Todes 290 300.

Novocain und ähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf Thrombozyten:

a) Novocain hydrochl. 200 mg% + Na-citr. 190 mg%:

5 Min.	16%	77%	7%	--
30 "	18%	61%	21%	--
60 "	24%	63%	13%	--

Gesamtzahl: 136/348/336

b) Novocain hydrochl. 100 mg% + Na-citr. 380 mg%:

60 Min.	4%	41%	37%	18%

Gesamtzahl: 368

c) Novocamid 50 mg% + Na-citr. 380 mg%:

30 Min.	9%	59%	12%	20%
60 "	10%	56%	8%	26%

Gesamtzahl: 342/382

d) Panthesin 100 mg% + Na-citr. 300 mg%:

5 Min.	39%	39%	14%	8%
30 "	40%	48%	9%	3%
60 "	30%	35%	27%	8%

Gesamtzahl: 44/33/72

e) Panthesin 50 mg% + Na-citr. 300 mg%:

5 Min.	30%	36%	34%	--
30 "	6%	40%	40%	14%
60 "	8%	30%	34%	28%

Gesamtzahl: 72/229/327

f) Panthesin 10 mg% + Na-citr. 300 mg%:

60 Min.	5%	11%	25%	59%

Gesamtzahl: 342

Ergebnis der Versuche a) bis f):

Da Novocain und Panthesin keine wesentliche gerinnungshemmende Wirkung haben, setzten wir dem Blut Na-citr. zu. Novocain hydrochl. 200 mg% setzt die Adhäsion deutlich herab, die Evolution wird weitgehend aufgehoben. Es fanden sich in der Mehrzahl Pseudopodienformen mit kurzen stummelartigen Pseudopodien. Ausbreitung war nur angedeutet meist am Grund eines Pseudopodiums. Die Werte nach 5, 30 und 60 Minuten sind im Wesentlichen identisch; daraus ergibt sich, daß nach Einsetzen der Ausbreitung des Plasmas an einer Stelle des Thrombozyten die Evolution nicht notwendig fortschreiten muß; die Entwicklung läßt sich in jedem Stadium, auch nach begonnener Ausbreitung hemmen.

Bei einer Konzentration von 100 mg% war die Adhäsion die gleiche, während die Evolution um 20% beschleunigt war. Novocamid 50 mg% zeigt eine Wirksamkeit, die diejenige von Novocain 100 mg% etwas übertrifft. Nach 1 Std. überwogen mit 56% die Pseudopodienformen. Bezgl. der Adhäsion ergab sich das gleiche Bild wie unter Einwirkung von Novocain hydrochl.

Anhang:

Na-Citrat : 3,8 %ige, isotone Lösung

Na-Oxalat : 1,34 %ige, isotone Lösung

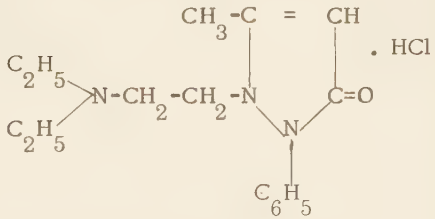
Di-Na-Sequestren : Di-amino-tetra-Essigsäure, 1 %ige wässrige Stammlösung, durch NaOH auf pH 7 titriert.

Sequestren-4-Novocain : Versuchspräparat, 5 %ige Stammlösung.

"Versenol" : N-Hydroxy-äthyl-äthylen-diaminotriacetic. acid. (3basisches Salz), ein Präparat der Dow chemical Comp., Midland, Michigan 2 %ige wässrige Stammlösung. Isotonie experimentell bestimmt

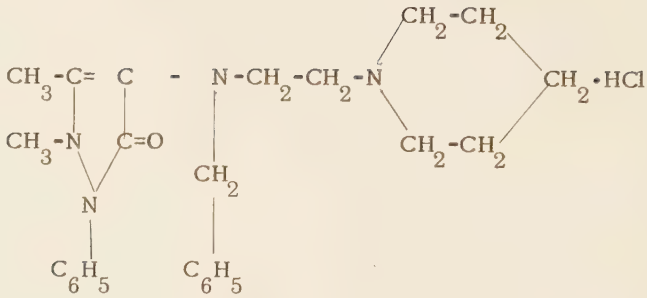
Diäthyl-amino-essigsäure : 1 %ige wässrige Stammlösung, Isotonie experimentell bestimmt

Substanz I :



1 %ige wässrige Stammlösung
Isotonie experimentell bestimmt

Substanz II



1 %ige wässrige Stammlösung.
Isotonie experimentell bestimmt

Novocain : 1,34 %ige kliniksübliche Stammlösung

Novocamid : p - Amino - N -(2-diaethylamino-aethyl) benzamid hydrochl.
10 %ige Lösung.

Panthesin ("Sandoz") : N-Diaethylleucinolester der p-Aminobenzoesäure

Panthesin 100 mg% hebt die Klebrigkeit der Thrombozyten weitgehend auf. Die evolutionshemmende Wirkung ist im Vergleich zu Novocain doppelt so stark. Unter fallender Konzentration sahen wir bei 50 mg% etwa den gleichen Effekt wie bei Novocain hydrochl. 100 mg%. Bei 10 mg% war die Evolution nach 1 Std. auf etwa 60 % Ausbreitungsformen angestiegen, während die Adhäsion immer noch gleichbleibend stark gehemmt war.

Panthesin und Novocamid erweisen sich damit Novocain überlegen.

Die Wirkung von Heparinen und Heparinoiden:

1) Versuche bei einer Temperatur von 20 bis 22°C:

a) α-Heparin "Novo" 15 mg%: (siehe Abb. 9)

5 Min.	3%	9%	66%	22%
30 "	2%	3%	15%	80%
60 "	3%	7%	10%	80%

Gesamtzahl: 640/660/632

b) "Elheparin" 15 mg%:

5 Min.	6%	25%	50%	19%
30 "	1%	8%	12%	79%
60 "	4%	7%	16%	73%

Gesamtzahl: 600/824/788

c) G-Heparinoid 31150/I 15 mg%:

5 Min.	13%	63%	22%	2%
30 "	7%	42%	17%	34%
60 "	7%	48%	9%	36%

Gesamtzahl: 454/530/608

d) G-Heparinoid 31150/I 7,5 mg%:

5 Min.	7%	50%	42%	1%
30 "	4%	15%	50%	21%
60 "	8%	8%	27%	57%

Gesamtzahl: 302/526/408

e) Novocain-Heparinoid (Polyaethensulfat) 15 mg%:
(15 mg% Hep., 24,5 mg% Novoc.)

5 Min.	5%	60%	29%	6%
30 "	14%	44%	16%	26%
60 "	8%	46%	12%	34%

Gesamtzahl: 456/412/636

f) Laevan-sulfat 15 mg%:

5 Min.	7%	48%	39%	6%
30 "	5%	14%	10%	71%
60 "	9%	7%	5%	79%

Gesamtzahl: 528/668/772

g) Laevan-sulfat-Novocain 15 mg%:

60 Min.	12%	5%	12%	71%

Gesamtzahl: 868

h) Dextran-Sulfat 15 mg%:

5 Min.	7%	22%	69%	2%
30 "	6%	9%	20%	65%
60 "	5%	4%	7%	84%

Gesamtzahl: 616/548/688

i) "Thrombocid" 15 mg%: (siehe Abb. 10)

5 Min.	9%	48%	34%	9%
30 "	9%	45%	19%	27%
60 "	4%	24%	15%	57%

Gesamtzahl: 372/454/498

Ergebnis der Versuche a) bis i):

Unter der Einwirkung von α-Heparin 15 mg% war bereits nach 5 Min. die Evolution sehr weit fortgeschritten, es fanden sich 66 % in beginnender Ausbreitung. Nach 30 Min. war die Evolution praktisch abgeschlossen mit 80 % Endausbreitungsformen. Die Adhäsion war ebenfalls sehr hoch. Auf der Folie befanden sich nach 30 Min. reichlich Agglutinate, die eine exakte Auszählung sehr erschwerten.

Elheparin zeigte eine Wirkung, die -Heparin etwa entsprach.

Unter dem Einfluß dieser beiden getesteten Substanzen wird also Adhäsion und Evolution nur geringfügig gehemmt.

G-Heparinoid ("Geigy") weist im Gegensatz hierzu einen stärkeren Einfluß auf Thrombozyten auf. Unter der Einwirkung von 15 mg% betrug die Hemmung der Evolution etwa das Doppelte, die Adhäsion war eben-

falls etwas stärker gehemmt. Bei Einwirkung von 7,5 mg% lagen die Werte der Evolution immer noch wesentlich unter denjenigen von α-Heparin 15 mg%; die Verminderung der Zahl klebender Thrombozyten war wohl auf die Bildung von Agglutinaten zurückzuführen, die sich auf der Folie in größerer Zahl fanden.

Novocain - Polyaethensulfat - Heparinoid bewirkte entsprechend der oben aufgeführten Prüfung von Novocain eine starke Hemmung der Evolution: Nach 60 Min. wurden bei 34 % ausgebreiteten Thrombozyten noch 46 % Pseudopodienformen gefunden.

Bei Laevan - und Dextransulfat konnten wir nur eine sehr minimale Wirksamkeit feststellen; etwa 2/3 der Thrombozyten waren bereits nach 30 Minuten ausgebreitet. Auch die Adhäsion erreichte sehr hohe Werte. Die Ergebnisse entsprachen im großen Ganzen den durch α-Heparin und Elheparin erzielten.

Auch Laevansulfat - Novocain zeigte keine höhere Wirksamkeit.

Thrombocid setzte die Adhäsion etwa um 1/3 gegenüber dem α-Heparin herab, ebenso war die Hemmung der Evolution um etwa 1/3 stärker.

Sämtliche bisher getesteten Heparine und Heparinoide wiesen eine relativ geringe Beeinflussung von Evolution und Adhäsion auf. Eine Bildung von Agglutinaten wird unter ihrer Einwirkung nicht verhindert. Lediglich Thrombocid und Geigy-Heparinoid hat eine stärkere spez. Wirksamkeit.

2) Versuche bei einer Temperatur von 37°C:

a) α-Heparin "Novo" 15 mg%: (siehe Abb. 11)

5 Min.	15%	72%	8%	5%
30 "	15%	70%	10%	5%
60 "	12%	70%	10%	8%

Gesamtzahl: 512/528/636

b) Thrombocid 15 mg%: (siehe Abb. 12)

5 Min.	12%	40%	38%	10%
30 "	9%	44%	38%	9%
60 "	9%	43%	40%	8%

Gesamtzahl: 532/540/612

Ergebnis der beiden obigen Versuche:

Wie bereits oben bei Versuchen mit Na-citrat erhielten wir auch hier unter einer Temperatur von 37 °C Ergebnisse, die sich wesentlich von den gleichen unter 20 °C durchgeführten Versuchen unterscheiden. Unter Einfluß von α-Heparin "Novo" war die Evolution sehr stark gehemmt, es fanden sich 82 % der Thrombozyten ohne Zeichen einer Ausbreitung. Wiederum ist auffallend, daß mit Ablauf der Zeit bis zu 60 Minuten praktisch keine Evolution zu beobachten ist; die 5 Min.-Werte entsprechen den nach 60 Minuten erhaltenen Werten. Auch hier scheint also eine "absolute Hemmung" eingetreten zu sein.

Die Adhäsion übertraf nicht die entsprechenden Werte der Versuche unter 20 °C.

Unter Einfluß von Thrombocid 15 mg% erhielten wir bezgl. der Adhäsion die gleichen Ergebnisse. Die Evolution war ebenfalls stark gehemmt, jedoch wurde hier eine größere Zahl Thrombozyten in Stadium III vorgefunden: 52 % Thrombozyten ohne Zeichen einer Ausbreitung stehen 40 % in beginnender Ausbreitung gegenüber.

Durch diese beiden Versuche werden die bereits oben erzielten Ergebnisse bestätigt, wonach Thrombozyten unter Einwirkung eines gerinnungshemmenden Agens bei einer Temperatur von 37 °C in ihrer morphologischen Struktur wesentlich stabiler sind als unter Temperaturen von etwa 20 °C. Die möglichen Ursachen dieser Erscheinung wurden bereits oben diskutiert. (Siehe Seite 25-26.

III. Das Verhalten von Thrombozyten unter Einwirkung einiger klinisch interessanter Pharmaka:

a) "Sintrom" 1 mg% + Na-citr. 380 mg%:

5 Min.	14%	55%	29%	2%
30 "	9%	33%	20%	38%
60 "	8%	36%	22%	34%

Gesamtzahl: 326/726/544

b) "Sintrom" 100 γ % + Na-citr. 380 mg%:

5 Min.	4%	13%	79%	4%
30 "	7%	8%	27%	58%
60 "	2%	7%	12%	79%

Gesamtzahl: 752/688/728

Ergebnis der Versuche a) und b):

Über eine direkte Wirkung dieses Cumarin-Derivates auf Thrombozyten war bisher nichts bekannt. Die Cumarine haben bekanntlich keine direkt gerinnungshemmende Wirkung, sondern beeinflussen diese über den Leberstoffwechsel durch Hemmung der Prothrombin-Bildung in der Leber.

Wir fanden bei einer Konzentration von 1 mg% (unter Zusatz von Na-citr. 380 mg% zur Hemmung der Blutgerinnung) eine deutliche Evolutionshemmung, die den Citrat-spezifischen Effekt um das Doppelte übertraf. Die Hemmung der Adhäsion übertraf kaum die allein durch Na-citr. hervorgerufene Wirkung. Bei einer Konzentration von 100 γ % war nur der Citrat-spez. Effekt zu beobachten.

c) Thrombodym 100 mg%: (Siehe Abb. 13)

5 Min.	37%	42%	21%	--
30 "	33%	40%	14%	13%
60 "	24%	37%	20%	19%

Gesamtzahl: 472/484/528

d) Thrombodym 5 mg% + Na-citr. 380 mg%:

5 Min.	5%	39%	55%	1%
30 "	4%	22%	42%	32%
60 "	7%	14%	34%	45%

Gesamtzahl: 542/536/484

Ergebnis der Versuche c) und d):

Thrombodym, ein Neodymsalz der Sulfo-iso-Nicotin-säure bewirkt in einer hohen Konzentration von 100 mg% eine starke Hemmung der Evolution; Auffallend ist eine große Zahl Thrombozyten in Stadium I, die mit 24 % diejenigen in Stadium IV (19 %) übertreffen. Die Adhäsion entspricht etwa Werten, die wir durch Citrat 380 mg% erhielten. Unter 5 mg% sehen wir noch immer eine leichte Herabsetzung der Evolution auf 45 % Ausbreitungsformen (nach 60 Min.), während die Adhäsion gleich geblieben ist.

e) "Hibernon" 10 mg% + Na-citr. 380 mg%:

5 Min.	53%	14%	33%	--
30 "	42%	19%	33%	6%
60 "	32%	19%	35%	14%

Gesamtzahl: 21/32/44

f) "Hibernon" 2,5 mg% + Na-citr. 380 mg%:

5 Min.	35%	25%	40%	--
30 "	30%	40%	17%	13%
60 "	20%	32%	20%	28%

Gesamtzahl: 40/77/103

g) "Hibernon" 1 mg% + Na-citr. 380 mg%:

60 Min.	8%	30%	17%	45%

Gesamtzahl: 268

Ergebnis der Versuche e) bis g):

Hibernon, eine synthetische Antihistamin-Substanz zur Behandlung allergischer Erkrankungen, (chemische Bezeichnung: p-Brombenzyl-α-pyridyl-dimethyl-amino-aethylamin-hydrochlorid) zeigt eine deut-

liche Wirkung auf Thrombozyten. Unter einer Konzentration von 10 mg% ist ihre Adhäsion auf 10 % der Citrat-Werte herabgesetzt, die Evolution ist mit 14 % Endausbreitungsformen ebenfalls sehr niedrig. Unter Einwirkung von 2,5 mg% ist die Adhäsion und Evolution gegenüber 10 mg% etwa verdoppelt, weist aber noch sehr niedrige Zahlenwerte auf: nach 60 Min. sahen wir noch 52 % der 103 ausgezählten Thrombozyten ohne Zeichen einer Ausbreitung. Bei einer Konzentration von 1 mg% war noch immer eine beachtliche Herabsetzung von Evolution und Adhäsion zu beobachten, die die Citratspez. Wirkung bei Weitem übertraf. Bei f) und g) sahen wir eine größere Zahl Agglutinate auf der Folie.

Im Tierversuch wurde die Toxicität von Hibernon geprüft: Wir injizierten einem gesunden Kaninchen 20 mg Hibernon langsam i.v. Sofort nach Injektion entnahmen wir Blut, dessen Gerinnung mit Na-citr. 380 mg% gehemmt wurde. Nach 30 Min. klebten auf der Folie praktisch keine Thrombozyten; einzelne Agglutinate wurden beobachtet, deren Thrombozyten sich jedoch nicht ausbreiteten.

Anhang:

α-Heparin "Novo"	: Na-Mucoitinpolysulfat, 5 %ige Stammlösung
"Elheparin"	: 5 %ige Stammlösung eines tierischen Heparinkörper-Präparates.
G-Heparinoid 31150/I	: 5 %ige Stammlösung eines Pectin-Derivates (Versuchspräparat).
Novocain-Heparinoid (Polyaethensulfat)	: Versuchspräparat (Dr. MARX)
Laevan-Sulfat	: Versuchspräparat (Dr. MARX)
Laevan-sulfat-Novocain	: 5 %ige Stammlösungen, hergestellt auf Veranlassung von Dr. R. MARX
Dextran-sulfat	: Substanzen in physiol. NaCl gelöst, 0,5 %ige Lösung

"Thrombocid"	: Depot-Thrombocid, 30 %ige Stammlösung
"Sintrom" ("Geigy")	: 3-(α-4(Nitrophenyl)-β-acetyl-äthyl)-4-oxycumarin
"Thrombodym"	: Neodymsalz der 3-sulfo-isonicotinsäure 2,5 %ige wässrige isotone Stammlösung unter Zusatz von 0,7 % NaCl.
"Hibernon"	: Brombenzyl-α-pyridyl-dimethyl-aminoäthylamin-hydrochlorid, ein Präparat der "Diwag", Chem. Fabriken A.G., Berlin.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Zum Abschluß dieses Kapitels seien die Ergebnisse noch einmal kurz zusammengefasst:

Na-Citrat zeigt mit fallender Konzentration von 760 bis 190 mg% eine deutlich zunehmende zeitliche Beschleunigung der Evolution, jedoch wird ein Grenzwert von ca. 70 % völlig ausgebreiteter Thrombozyten nach 60 Minuten Sedimentationszeit nicht überschritten; die Adhäsion ist auf etwa 1/4 vermindert.

Na-Oxalat zeigt eine ähnliche Wirksamkeit.

Sequestren hebt sowohl Adhäsion wie Evolution in Konzentration über 100 mg% weitgehend auf, während wir unter 50 mg% keine wesentliche Wirksamkeit mehr feststellen konnten.

Versenol vermag in Konzentration von 200 mg% nur die Adhäsion deutlich zu beeinflussen, während die Evolution hohe Werte erreicht.

Substanz I weist unter einer Konzentration von 100 mg% eine Hemmung der Evolution auf, die das Doppelte des Citrat-spez.Effektes beträgt, wogegen Substanz II in gleicher Konzentration Evolution und Adhäsion fast völlig hemmt, bei einer Konzentration von 50 mg% nur eine Endausbreitung von 10 % der Thrombozyten zuläßt und auch unter

Einwirkung von 10 mg% noch eine deutliche Hemmwirkung auf Evolution und Adhäsion aufweist.

Im Vergleich zu Novocain, das in hohen Konzentrationen eine starke Beeinflussung von Blutplättchen zeigt, hat Novocamid eine Wirkung doppelten Grades: Bei 50 mg% stehen nach 60 Min. noch 66 % der Thrombozyten in Stadium I und II.

Eine annähernd gleiche Wirksamkeit beobachten wir bei Einwirkung von Panthesin auf Thrombozyten.

α-Heparin und Elheparin 15 mg% hemmen bei 20°C weder Evolution noch Adhäsion in stärkerem Umfang, während G-Heparinoid I 15 mg% eine Hemmung der Evolution hervorruft, die den Citrat-Effekt um das Doppelte übertrifft; das gleiche Ergebnis erhielten wir mit Novocain-Polyaethensulfat. Die übrigen getesteten Heparinoide zeigen, abgesehen von Thrombocid, keine auffallende Wirkung.

Sintrom (1 mg%) hemmt deutlich die Evolution; nach 60 Minuten vermag nur etwa die Hälfte der Plättchen in Ausbreitung überzugehen.

Thrombodym 100 mg% hemmt die Evolution um 4/5, während die Adhäsion mit Citrat vergleichbare Werte erreicht.

Hibernon zeigt die stärkste beobachtete Wirksamkeit auf Thrombozyten bis herab zu einer Konzentration von 1 mg%; es scheint jedoch die Agglutination nicht zu verhindern, u.U. sogar zu fördern.

Drei Substanzen, Na-Citrat, α-Heparin und Thrombocid prüften wir zusätzlich unter einer Versuchstemperatur von 37°C. Hierbei beobachteten wir bei Citrat eine fast vollständige Hemmung der Evolution; es fanden sich 90 % Plättchen in Stadium I und II. Ein ähnliches Ergebnis erhielten wir mit α-Heparin, während bei Thrombocid das Ausmaß der Hemmung geringer war. Die Adhäsion entsprach etwa der unter einer Versuchstemperatur von 20°C erzielten.

IV. Das Verhalten von Thrombozyten bei verschiedenen hämorrhagischen Diathesen:

Im Folgenden werden Ergebnisse geschildert, die wir bei Untersuchungen verschiedener hämorrhagischer Diathesen bez. der Eigenschaften von Thrombozyten erzielten.

Wir setzten dem Patienten-Blut als gerinnungshemmendes Agens Na-citr. 760 mg% zu. Es lassen sich also bez. Adhäsion und Evolution nur solche Werte im Sinne eines krankheitsspezifischen Effektes verwerten, die den allein auf die Einwirkung des Citrates zurückzuführenden Effekt übertreffen.

1) Hämophilie B :

a) Patient Ec. :

5 Min.	12%	35%	47%	6%
30 "	2%	47%	41%	9%
60 "	6%	39%	37%	18%

Gesamtzahl: 270/482/567

Die Evolution war sehr stark verzögert, die Plättchen befanden sich in der Mehrzahl in Stadium II. Die Werte des 60 Min.-Präparates zeigten keinen wesentlichen Unterschied zu denjenigen des 5 Min.- und 30 Min.-Präparates. Das Granulomer war kompakt und meist undurchstrahlbar. Die Adhäsion lag im Bereich des Normalen.

b) Patient Haus. :

60 Min.	2%	3%	10%	85%

Gesamtzahl: 672

Im Gegensatz zu dem oben angeführten Fall war hier die Ausbreitung deutlich beschleunigt, die Zahl der völlig ausgebreiteten Plättchen war um etwa 20 % erhöht gegenüber Normalpersonen. Auf der Folie klebten zahlreiche Leukozyten.

2) Hämophilie B verbunden mit weiteren pathologischen Befunden:

a) Patient Dadl.:

30 Min.	25%	30%	33%	12%
60 "	17%	35%	27%	21%

Gesamtzahl 150/322

Befund:

Bei beiden Präparaten war die Evolution stark gehemmt, die Adhäsion war leicht vermindert.

Neben einem Faktor IX-Mangel wurde bei diesem Patienten ein leichter Mangel Faktor VII und eine Hypertonie festgestellt. Das Thrombelastogramm (TEG) weist eine leichte anhaltende Verschmälerung auf, die auf Injektion von Tachostyptan oder Zugabe von Gewebsthrombokinase normalisiert werden kann.

b) Patientin Abent.:

60 Min.	15%	57%	11%	17%

Gesamtzahl: 260

Befund:

Bei herabgesetzter Adhäsion war die Evolution sehr stark gehemmt; es zeigten insgesamt nur 28% der Plättchen Zeichen einer Ausbreitung.

Bei einem RR von 110/70 betrug die Nativblut-Gerinnungszeit 14', die Blutungszeit war mit 5' 25" verlängert. Serumprothrombin normal, Faktor VIII normal. (Angiohämophilie B ?)

c) Patient Leit.:

30 Min.	4%	34%	20%	42%
60 "	6%	25%	24%	45%

Gesamtzahl: 332/344

Befund:

Die Hemmung der Evolution war hier geringer als in den vorangegangenen Fällen, die Zahl der ausgebreiteten Plättchen lag jedoch noch um ca. 20 % unter der Norm. Neben dem Faktor IX-Mangel wurde hier ein Faktor VIII-Mangel festgestellt. Die Blutungszeit war verlängert, die Thrombozytenzahl betrug 126 000; bemerkenswert ist, daß die Schwester des Patienten denselben sonstigen Befund bei normaler Thrombozytenzahl hat.

d) Patientin Hub.R. :

60 Min.	8%	34%	17%	41%

Gesamtzahl: 656

Befund:

Bei hoher Adhäsion war die Evolution deutlich gehemmt.

Faktor IX wies ein Defizit von 50 % auf, Faktor VIII war leicht vermindert. Das TEG und die Prothrombinzeit waren normal, während die Thrombozytenzahl 150 000 betrug.

Da trotz dieser geringen Zahl die der haftenden Plättchen sehr hoch war, kann angenommen werden, daß ihre Klebrigkeit erhöht war.

e) Patient Hieb. :

5 Min.	14%	41%	44%	1%
30 "	7%	37%	41%	16%
60 "	3%	27%	54%	16%

Gesamtzahl: 71/346/470

Befund:

Die Evolution war auch in diesem Falle deutlich gehemmt, die Plättchen in Stadium III zeigten eine nur geringfügige beginnende Ausbreitung; das Granulomer war in der Mehrzahl undurchstrahlbar.

Die Blutungszeit war verlängert, die Nativblut-Gerinnungszeit stellte mit 10 1/4 Min. einen Grenzwert dar.

TEG: r 10', k_1-8', mε-92 (Grenzwert). Prothrombinzeit 12 1/2 sec. Serum-Prothrombin-Grenzwert. RR 90/65. Mäßige Hypo-γ-globulinämie (13,4 %). Thrombozytenzahl 170 000.

Ergebnis der vorstehenden Versuche:

Es wurden zwei Fälle von Hämophilie B sowie 5 Fälle Hämophilie B, die jedoch noch weitere patholog. Befunde zeigten, untersucht. In 4 Fällen beobachteten wir eine sehr starke Hemmung der Evolution; der prozentuale Anteil der Plättchen in Stadium IV an der Gesamtzahl schwankte hier zwischen 16 und 21 % gegenüber der Norm von 60 bis 70 % ausgebreiteter Thrombozyten. Bei 2 Patienten war die Hemmung etwas geringer, (41 bezw. 45 % Plättchen Stadium IV); in diesen beiden Fällen bestand ein Mangel an Faktor IX und VIII. Bei einem Patienten (klassische Hämophilie B !) war eine deutliche Beschleunigung der Evolution zu beobachten.

3) Hämophilie A :

a) Patient Kamm. :

5 Min.	15%	50%	27%	8%
30 "	1%	37%	37%	25%
60 "	5%	20%	28%	47%

Gesamtzahl: 59/313/262

Befund:

Die Evolution war leicht gehemmt, es fanden sich vermehrt Pseudopodienformen. Bei Stadium III war die Ausbreitung oft nur angedeutet in Form von kleinen Knötchen an den Pseudopodien.

Die Nativblut-Gerinnungszeit betrug 1 Stunde.

b) Patient Neuhäu. :

5 Min.	1%	25%	61%	3%
30 "	1%	12%	27%	60%
60 "	3%	9%	28%	60%

Gesamtzahl: 1252/1212/1520

Befund:

Die Adhäsion war stark erhöht, während die Evolution normale Werte zeigte.

Der Patient hatte während des Krieges einen Herzsteckschuß erhalten; aus dem Kymogramm ist ersichtlich, daß das Projektil bei den Herz-

aktionen mitbewegt wird. Der Patient ist in seiner Leistungsfähigkeit nicht beeinträchtigt.

c) Patient Sagst. :

60 Min.	1%	6%	21%	72%

Gesamtzahl: 1094

Befund:

Auffallend war hier wiederum die hohe Zahl haftender Plättchen. Die Evolution lag im Bereich der Norm, jedoch sind die Thrombozyten relativ klein.

Die Nativblut-Gerinnungszeit betrug 20 Minuten, das Serum-prothrombin war pathologisch hoch.

d) Patient Mar. :

60 Min.	6%	10%	9%	75%

Gesamtzahl: 468

Befund:

Die Evolution war leicht beschleunigt, die Plättchen weit ausgebreitet. Adhäsion normal.

e) Patient May. :

60 Min.	21%	8%	18%	53%

Gesamtzahl: 770

Befund:

Die Adhäsion war normal, während die Evolution leicht gehemmt scheint. Die Zahl der Plättchen in Stadium I war deutlich vermehrt, wogegen Pseudopodienformen fast nicht auftraten. Die Konturen der Rundformen schienen "ausgefranst" und zeigten einen dunklen Saum.

Die Nativblut-Gerinnungszeit war größer als eine Stunde, das Serumprothrombin pathologisch erhöht.

f) Patient Hub.:

30 Min.	7%	21%	22%	50%

Gesamtzahl: 562

Befund:

Evolution und Adhäsion waren in diesem Falle normal. Die Blutungszeit betrug 18' 30", ("vascularis" Hämophilie A), die Nativblut-Gerinnungszeit betrug 13 Min., das TEG zeigte pathologische Werte. RR 145/80. Thrombozytenzahl 184 000.

Ergebnis der obigen Versuche:

Es wurden die Thrombozyten von 6 Patienten untersucht, die im Serum einen Faktor VIII-Mangel aufwiesen. In zwei Fällen war die Evolution leicht gehemmt, in einem Falle geringfügig beschleunigt und in drei Fällen normal. Bei zwei Patienten wurde eine außerordentlich starke Erhöhung der Zahl klebender Thrombozyten beobachtet.

4) Faktor V-Mangel:

Patient Kasch. :

Bei einem 1-Stunden-Präparat stellten wir eine starke Erhöhung der Adhäsion fest; es klebten etwa 12 bis 15 00 Thrombozyten, von denen etwa 90 % zu Stadium IV ausgebreitet waren. In Granulomer und Hyalomer sahen wir eine starke Vokuolenbildung.

5) Morbus Werlhof:

Patient Tah., Belb. :

Die Thrombozyten waren in der Mehrzahl außerordentlich weit und völlig rund ausgebreitet. Sie waren wesentlich größer als normale Thrombozyten. Das Granulomer erschien groß und kompakt, oft von Vakuolen durchsetzt. Auf der Folie klebten neben diesen "Riesenausbreitungsformen" sehr kleine runde Körperchen, die u.U. sehr kleine Plättchen darstellen dürften. Die hier ausschließlich auftretenden "Riesenausbreitungsformen", die sich morphologisch deutlich von normalen Thrombozyten unterscheiden, sahen wir in Normalpräparaten zu etwa 2 bis 5 %. Die Adhäsion entsprach der Plättchenzahl von 20 000.

60 Min.	--	14%	5%	81%

Gesamtzahl: 42

6) Chron. myel. Leukämie:

Patient Manocl. :

60 Min.	4%	9%	15%	72%

Gesamtzahl: 442

Adhäsion und Evolution waren normal. Neben Thrombozyten klebten auf der ausgewerteten Folienfläche etwa 40 Leukozyten.

Thrombozytenzahl: 20 000

Leukozytenzahl: 120 000

7) Thrombopathie Naegeli:

a) Patientin L., Ilse :

5 Min.	66%	34%	--	--
30 "	27%	37%	35%	1%
60 "	23%	24%	46%	2%

Gesamtzahl: 20/63/90

Die Zahl der klebenden Thrombozyten war sehr klein, die Evolution stark gehemmt. Bei Stadium II sind die Pseudopodien kurz, oft stummelartig. Die Konturen der Plättchen waren unscharf und unregelmäßig, das Granulomer kompakt.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Evolutionshemmung lediglich um eine zeitliche Verzögerung der Ausbreitung handelte, beschickten wir eine Kammer mit Blut, das wir 16 Stunden sedimentieren ließen. Es klebten etwa 200 Plättchen, von denen etwa 50 % keinerlei Ausbreitung zeigten. Auflösungserscheinungen waren nicht zu beobachten.

b) Patientin L., Hildegard :

5 Min.	25%	33%	42%	--
60 "	33%	49%	13%	5%

Gesamtzahl: 24/127

Adhäsion und Evolution waren auch hier stark gehemmt. Bei Stadium III zeigten sich nur geringe Ansätze zur Ausbreitung. Im Übrigen ergab sich etwa das gleiche Bild wie bei der unter a) aufgeführten Patientin. (Schwester)

c) Patient L., Hans-Rudolf:

5 Min.	7%	44%	47%	2%
30 "	4%	40%	34%	22%
60 "	2%	8%	10%	80%

Gesamtzahl: 566/652/976

Die Adhäsion war deutlich erhöht, die Evolution nach einer Stunde beschleunigt (80 % weit ausgebreitete Thrombozyten). Bei einem weiteren Präparat beließen wir das Blut 3 Stunden auf der Folie. Bei einer Gesamtzahl von 580 Plättchen befanden sich 91 % in Stadium III und IV. Es waren deutlich Auflösungserscheinungen zu beobachten. Auch bei einem 20 Stunden-Präparat waren im Gegensatz zu entsprechenden Präparaten von Hildegard und Ilse starke Auflösungserscheinungen zu sehen.

8) Erythrothrombozythämie:

Patientin Emp.:

5 Min.	22%	28%	40%	10%
30 "	10%	18%	21%	51%

Gesamtzahl: 2400/3840

In Anbetracht der außerordentlich hohen Zahl von Thrombozyten war die Auszählung und Differenzierung stark erschwert. Die Evolution war deutlich beschleunigt.

Bei den weiteren Untersuchungen wurde eine Verminderung der Faktoren VIII, IX und X festgestellt. Die Nativblutgerinnungszeit betrug 6 Minuten, das TEG zeigte folgende Werte: r - 10', k_1-2,5', mε-233.

Bei der Patientin handelt es sich um einen Zustand nach Milzexstirpation, bei Anämie (Blutungsfolge) bei Polyzythämia vera mit heftigen Milzschmerzen (Infarkte), die zur Milzexstirpation geführt hatte.

9) Chron., wahrscheinlich familiäre Thrombopenie:

Patient Weng. :

5 Min.	16%	37%	23%	24%
30 "	10%	33%	31%	26%

Gesamtzahl: 118/156

Die Adhäsion war nur scheinbar verringert, da die Thrombozytenzahl nur 68400 betrug. Die Evolution war normal. Auffallend war eine relativ hohe Zahl großer Plättchen.

10.) Diathesis hämorrhag. incerta:

a) Patient Greg., Bernhard:

60 Min.	13%	47%	21%	19%

Gesamtzahl: 1008

Die Adhäsion war erhöht, es klebten sehr viele Pseudopodienformen mit langen, deutlichen Pseudopodien. Die Evolution war stark gehemmt, die ausgebreiteten Plättchen (nur 19 %) waren verhältnismäßig klein.

Faktor VIII und IX waren normal, die Blutungszeit betrug 6 Minuten, die Thrombozytenzahl 224400. Im Blutbild wurden 11 % Eosinophile ausgezählt.

Es besteht die Möglichkeit, daß es sich um eine Angiohämophilie A handelt.

b) Greg., Norbert :

Adhäsion und Evolution im TMG sowie alle weiteren Laboruntersuchungen ergaben keine pathologischen Befunde.

Anhang:

Wir untersuchten die Thrombozyten von drei Patienten, die unter Einwirkung von Sintrom standen:

a) Patientin Baum. :

5 Min.	26%	32%	42%	--
30 "	10%	47%	38%	5%
60 "	10%	32%	36%	22%

Gesamtzahl: 106/1268/1256

Die Patientin stand seit 14 Tagen in Sintrom-Behandlung nach Myocardinfarkt. Die Evolution war stark gehemmt, die Zahl der haftenden Thrombozyten nach 30 und 60 Minuten außergewöhnlich hoch. Die Pseudopodien waren kurz und stummelartig. Wir untersuchten das Blut

derselben Patientin 5 Wochen später nocheinmal, nachdem das Präparat seit 14 Tagen abgesetzt war:

5 Min.	14%	52%	30%	4%
30 "	8%	41%	31%	20%
60 "	7%	45%	21%	27%

Gesamtzahl: 167/378/522

Die Evolution der Plättchen war auch weiterhin deutlich gehemmt, während die Adhäsion normale Werte zeigte.

b) Patient Hoff. :

60 Min.	2%	44%	29%	25%

Gesamtzahl: 1436

Der Patient wurde seit 11 Tagen mit Sintrom behandelt. (Nach einer Varizen-Thrombophlebitis). Auch hier wurde eine starke Evolutionshemmung beobachtet, sowie eine sehr hohe Zahl haftender Plättchen.

c) Patientin Günsbur.:

60 Min.	4%	4%	14%	78%

Gesamtzahl: 402

Die Patientin stand seit einem Jahr unter Sintrom-Dauertherapie bei Mitralstenose und Herzinsuffizienz. Die Adhäsion und Evolution waren in diesem Falle normal.

Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion:

Bei der Untersuchung der Evolution von Thrombozyten verschiedener hämorrhagischer Diathesen zeigte sich zum Teil eine beachtliche Abweichung von der Reaktionsnorm. Am eindruckvollsten sahen wir diese Abweichung bei 4 Fällen von Hämophilie B, deren Evolution zwischen 16 und 21 % schwankten. (Norm 60 bis 70 % Thrombozyten in Stadium IV). Diese Werte unterschreiten die normale Fehlerbreite von 5 bis 10 % bei weitem. Auffallend ist ferner die geringe Schwankungsbreite der 4 Fälle von nur 5 %.

Eingehende Untersuchungen zur Klärung der Ursache dieser Evolutionshemmung sind erforderlich. Es seien hier einige mögliche Ursachen diskutiert:

1) Infolge des Mangels an Faktor IX vermögen sich die Plättchen nicht so gut wie bei Normalen auszubreiten. Der Faktor IX stellt also zugleich einen evolutionsauslösenden- oder fördernden Faktor dar.

2) Die Thrombozyten vermögen sich nicht auszubreiten infolge Mangels eines weiteren, bisher unbekannten Faktors.

3) Im Serum befindet sich ein in bestimmten Fällen auftretender unbekannter Faktor, der die Evolution hemmt.

4) Es handelt sich um eine zusätzliche, anlagemäßige Schwäche der Thrombozyten selbst.

Es ist erforderlich, diese Möglichkeiten durch geeignete Methoden eingehend zu prüfen, z.B. Mischung von pathologischem Plasma mit Normalplasma und dergl. Es ist jedoch zu beachten, daß bei einem Teil der Fälle noch weitere pathologische Befunde erhoben wurden, die u.U. ebenfalls am Zustandekommen der Evolutionshemmung ursächlich beteiligt sein können.

Bei 5 Fällen von Hämophilie A konnten wir kein eindeutiges Ergebnis erzielen: Normalverhalten, leichte Hemmung oder Beschleunigung.

In einem Falle von Faktor-V-Mangel fiel die hohe Zahl haftender Thrombozyten auf, während die Evolution beschleunigt war.

Ein Fall von Morbus "Werlhof" zeigte bei einer Thrombozytenzahl von 20 000 eine entsprechend niedere Adhäsion. Die wenigen haftenden Thrombozyten stellten fast ausschließlich "Riesenausbreitungsformen" dar.

Ferner wurden drei Geschwister untersucht, die hereditär mit einer Thrombopathie Naegeli belastet sind. Bei den beiden Schwestern fanden wir eine starke Herabsetzung der klebenden Thrombozyten bei normaler Zahl im Blut auf etwa 10 bis 20 % der Norm, auch die Ausbreitung der Plättchen war außergewöhnlich stark gehemmt. Es zeigten sich zudem morphologische Abweichungen von der Norm. Bei dem dritten Geschwister sahen wir hingegen bei erhöhter Adhäsion eine deutliche Beschleunigung der Evolution und bereits nach drei Stunden Auflösungserscheinungen.

Ein Fall einer chron. myel. Leukämie zeigte abgesehen von einer größeren Zahl haftender Leukozyten kein auffallendes Ergebnis.

In einem Fall einer Erythrothrombozythämie war die Evolution beschleunigt, während bei einer idiopathischen Thrombopenie große Plättchen auffielen.

In einem Anhang werden die Ergebnisse von Untersuchungen dargelegt, die wir an 3 unter Einwirkung von Sintrom ("Geigy") stehenden Patienten anstellten. Nach bisheriger Auffassung hat Sintrom keinen direkten Einfluß auf Thrombozyten, es setzt die Koagulabilität des Blutes herab durch Hemmung der Bildung von Prothrombin, Faktor IX und X, sowie Faktor VII in der Leber. Bei 2 Patienten fanden wir eine sehr starke Minderevolution bei gleichzeitiger Erhöhung der Adhäsion. 14 Tage nach Absetzen des Präparates hielt die Evolutionshemmung an, sodaß die Frage zufälliger primärer Thrombozyten-Evolutionshemmung zu erwägen ist. Bei einer dritten Patientin, die seit einem Jahr unter Dauertherapie stand, erhielten wir normale Werte. Seite 39 wurde dargelegt, daß Sintrom 1 mg% auch in vitro eine Hemmung der Evolution bewirkt; dieser hohe Spiegel wird jedoch in vivo bei therapeutischer Dosierung nicht erreicht. Auch diese Versu-

che müßten weitergeführt werden mit dem Ziel, die Frage zu klären, ob die Hemmung der Evolution allenfalls durch direkte Einwirkung des Pharmakons auf die Plättchen zustande kommt oder durch Hemmung bezw. Aktivierung von Serumfaktoren in der Leber.

Aus den hier angeführten Fällen wird bereits ersichtlich, daß die Beurteilung der Evolution haftender Thrombozyten ein weiteres diagnostisches Hilfsmittel darstellt zur umfassenden Beurteilung und ursächlichen Klärung hämorrhagischer Diathesen.

Wir schlagen daher vor die Einführung eines "Evolutionsindex" (E.I.) zur Beurteilung der funktionsmorphologischen Veränderungen (Evolution) von Thrombozyten.

Im Evolutionsindex wird der in dem zu prüfenden Falle erhaltene prozentuale Anteil Plättchen in Stadium IV dividiert durch den gleichen durchschnittlichen Wert gesunder Normalpersonen:

$$E.I. = \frac{\text{Thrombozyten Stadium IV in \%}}{\text{Normwert Thrombozyten Stadium IV in \%}}$$

Beispiel:

1) In einem Normalfall (s.S.21) wurden 64 % ausgebreiteter Thrombozyten ausgezählt:

$$E.I. = \frac{64}{65} = 1$$

2) In einem Falle Hämophilie B (s.S.45) wurden 21 % ausgebreiteter Thrombozyten ausgezählt:

$$E.I. = \frac{21}{65} = 0,3.$$

3) In einem Fall Morbus Werlhof (s.S. 43) wurden 81 % ausgebreiteter Thrombozyten ausgezählt:

$$E.I. = \frac{81}{65} = 1,3$$

Die normale Schwankungsbreite liegt zwischen 0,8 und 1,2. Ein Evolutionsindex unter 0,8 und über 1,2 wäre als Abweichung von der Reaktionsnorm im Sinne eines pathologischen Befundes zu bewerten.

D. SCHLUSSWORT

Nach Abschluß vorliegender Arbeit scheint es angebracht, noch einmal zum Ausgangspunkt zurückzukehren. Die gestellte Aufgabe, eine möglichst exakte, jedoch einfache Methode zur Erfassung der Grundeigenschaften von Thrombozyten zu schaffen, scheint uns in Form des Thrombozyten-Metamorphogramms (TMG) weitgehend gelöst.

Mit Hilfe der ausgearbeiteten Methode wurde die pharmakologische Wirkung verschiedener Substanzen und handelsüblicher Präparate auf Thrombozyten untersucht. Bei Auswertung der Ergebnisse wurde deutlich, daß Evolution und Adhäsion voneinander unabhängige Eigenschaften der Thrombozyten sind, worauf bereits K. KÖHL hingewiesen hat. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die Evolution in Anwesenheit eines gerinnungshemmenden Agens weitgehend von der Temperatur abhängig ist. Es ist die Frage zu diskutieren, ob diese Hemmung lediglich auf einer Erhöhung der chemischen Aktivität des Pharmakons infolge erhöhter Temperatur beruht. Zeigte eine Substanz eine deutliche Wirksamkeit, so war nachzuweisen, daß es sich hierbei nicht um eine Funktionsschädigung der Thrombozyten handelte, sondern um eine reversible "Funktionsnarkose" (MARX).

Mit Hilfe des Thrombozyten-Metamorphogramms wurde ferner das Verhalten von Thrombozyten verschiedener hämorrhagischer Diathesen untersucht. Es zeigten sich zum Teil beachtliche Abweichungen von der Reaktionsnorm. Es wird vorgeschlagen, die Evolution haftender Thrombozyten durch einen Evolutionsindex (E. I.) zu erfassen. (s. S. 53) Wir glauben, daß es mit Hilfe des TMG möglich sein wird, einen wesentlichen Beitrag zu leisten zur Aufhellung der noch weitgehend ungeklärten Ursachen hämorrhagischer Diathesen.

Abb. 1 (s. Seite 19)
Fibrinnetz mit eingelagerten Thrombozyten, Nativblut

Abb. 1a (s. Seite 19)
Haftende Thrombozyten aus einem Nativ-Blut-Präparat

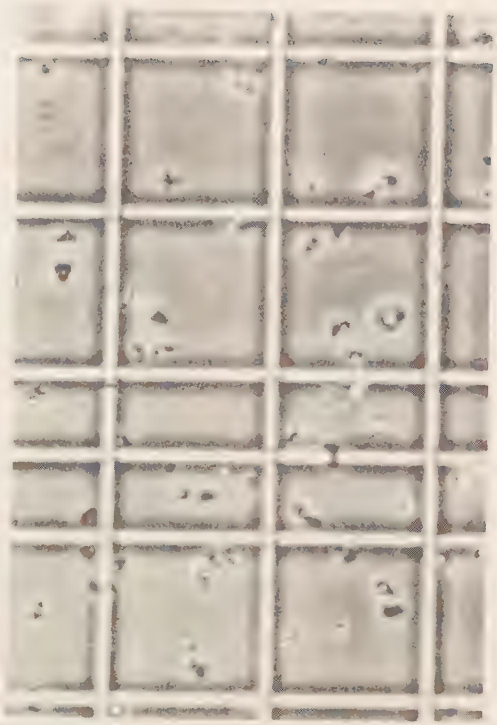


Abb. 2 (s. Seite 21)
Na citr. 760 mg%, 5 Min. 20 °C

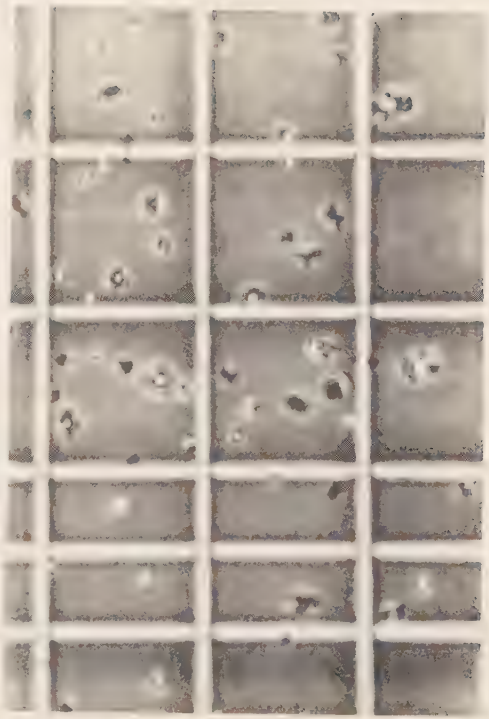


Abb. 2a (s. Seite 21)
Na citr. 760 mg%, 30 Min. 20 °C

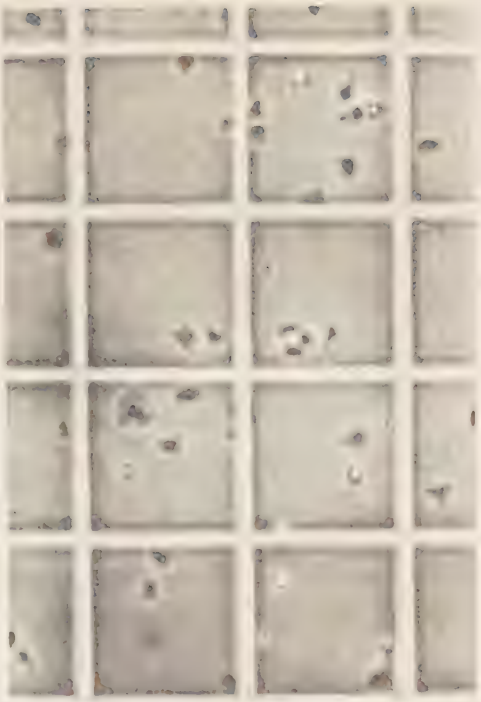


Abb. 3 (s. Seite 24)
Na citr. 380 mg%, 30 Min. 20°C

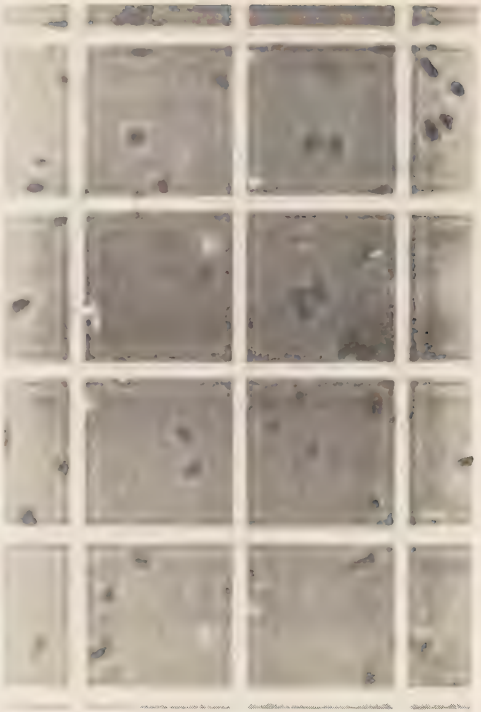


Abb. 4 (s. Seite 24)
Na citr. 380 mg%, 60 Min. 20°C

Abb. 5 (s. Seite 25)
Na citr. 760 mg%, 60 Min. 37 °C

Abb. 6 (s. Seiten 28 u. 29)
Di-Na-sequestren 100 mg%, 60 Min. 20 °C

Abb. 7 (s.Seiten 28 u. 3o)
Di-Na-Sequestren 50 mg%, 60 Min. 20°C

Abb. 8 (s.Seiten 29 u. 30)
Substanz II 50 mg%

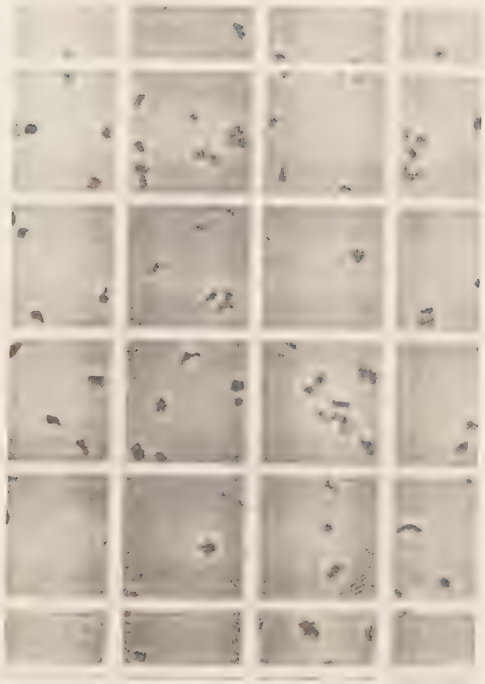


Abb. 9 (s. Seite 35)
Heparin "Novo" 15 mg%, 30 Min. 20°C

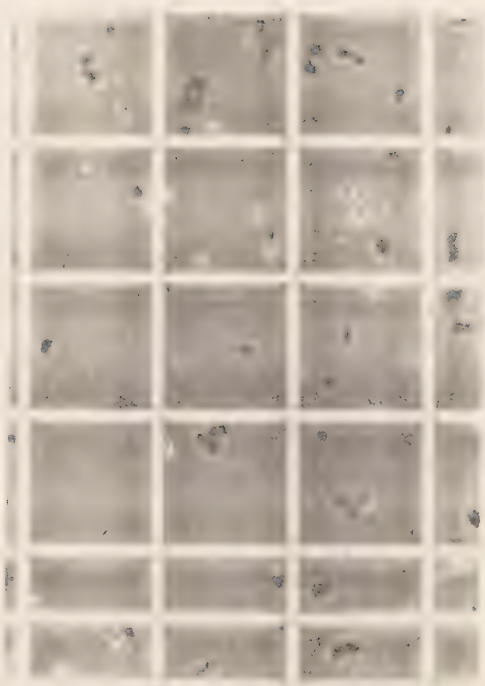


Abb. 10 (s. Seite 36)
Thrombocid 15 mg%, 60 Min. 20°C

Abb. 11 (s. Seite 37)
α-Heparin "Novo" 15 mg%, 60 Min. 37°C

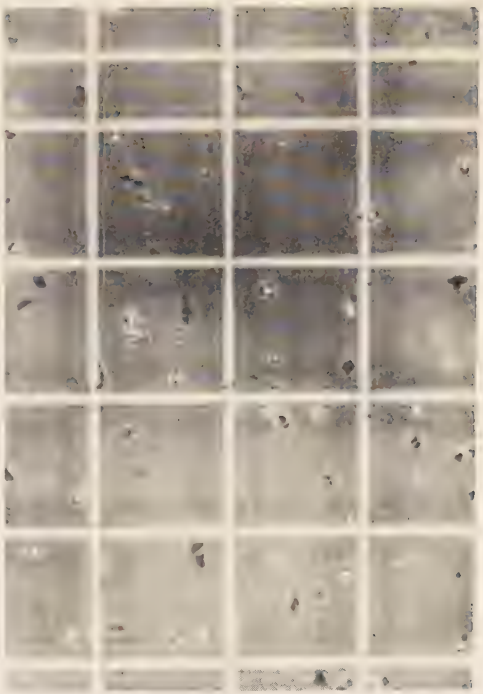


Abb. 12 (s. Seite 38)
Thrombocid 15 mg%, 60 Min. 37°C

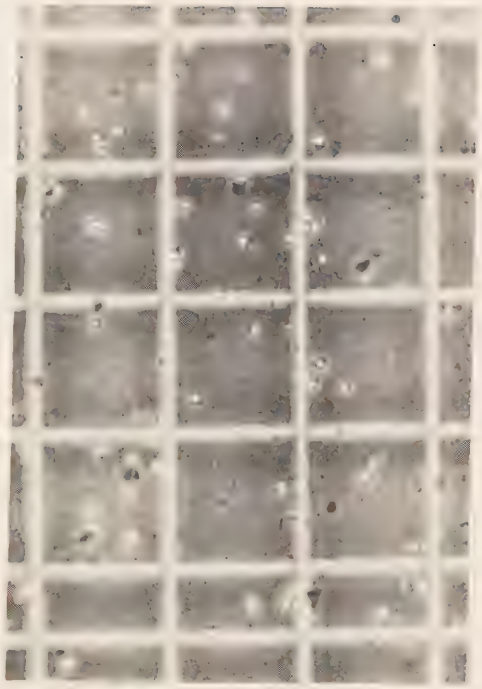


Abb. 13 (s. Seite 39)
Thrombodym 100 mg%, 30 Min. 20 °C

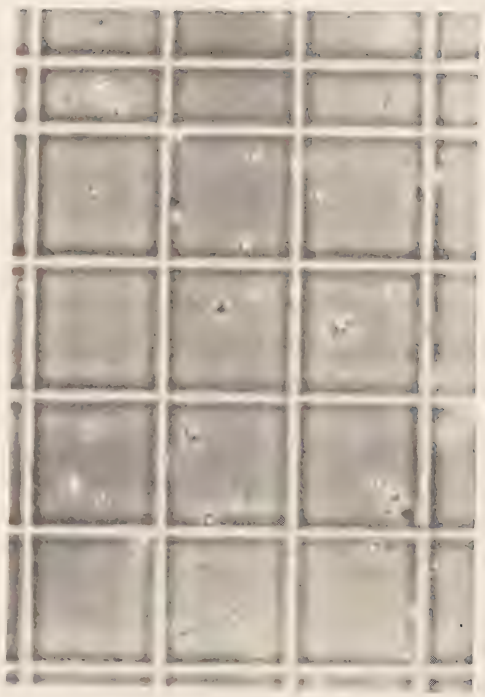


Abb. 14 (s. Seite 45)
Patientin Ab., Angio-Hämophilie B mit verlängerter Blutungszeit - Na citr. 760 mg%, 60 Min. 20 °C

Herrn Prof. Dr. SCHWIEGK danke ich für die Übernahme des Referates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Doz. Dr.R.MARX, der mir das Thema zu vorliegender Arbeit stellte, einen Laborplatz überließ und mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützte.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 15. Mai 1932 als Sohn des Stud.Prof. und Pfarrers Kurt Kreiter und seiner Frau Lotte, geb. Felsing, in Kaiserslautern geboren.

Nach 4-jähriger Volksschulzeit besuchte ich das Humanistische Gymnasium Kaiserslautern, wo ich im Jahre 1952 die Reifeprüfung ablegte.

Ich begann das Studium der Medizin an der Universität Tübingen und setzte es 1954 in München fort, wo ich im Jahre 1955 das Physikum ablegte. Nach einem Semester an der Universität Innsbruck kehrte ich zur Beendigung meines Studiums nach München zurück, wo ich am 2. Dezember 1958 das Staatsexamen abschloß.